

Capítulo VI

BIOCATÁLISIS APLICADA A LA SÍNTESIS DE FÁRMACOS (I) ENZIMAS HIDROLÍTICAS

María J. Hernáiz

RESUMEN

En este capítulo se presenta una introducción sobre la versatilidad de las enzimas hidrolíticas en las biotransformaciones y sus principales aplicaciones en la síntesis de fármacos. El capítulo principalmente está centrado en el estudio de dos tipos de hidrolasas, las lipasas y proteasas. En esas dos secciones, se describen los ejemplos de mayor interés industrial donde se han utilizado estas enzimas de diferentes orígenes para la obtención de fármacos.

Palabras clave: Biocatálisis; Hidrolasas; Lipasas; Proteasas; Fármacos.

ABSTRACT

Applied Biocatalysis in drugs synthesis (I) Hydrolitic enzymes

This Chapter presents an introduction about the versatility of hydrolytic enzymes in biotransformations and theirs applications in the synthesis of drugs. The chapter is focus mainly on two types of hydrolytic enzymes, lipases and proteases. These two sections describe examples of industrial interest where these enzymes from different origins have been used in the synthesis of drugs.

Keywords: Biocatalysis; Hydrolases; Lipases; Proteases; Drugs.

1. INTRODUCCIÓN

Durante la última década, la búsqueda de nuevas moléculas con actividad farmacológica se ha llevado a cabo mediante técnicas innovadoras. Los avances en diferentes campos, tales como la biología molecular, bioquímica, química orgánica y biotecnología, entre otros, han permitido el alcance de nuevos objetivos a través de procesos más eficaces y rápidos. Se han desarrollado muchos y nuevos métodos sintéticos que permiten la obtención de extensas librerías de productos con potencial actividad terapéutica. En este sentido, el empleo de biocatalizadores, tanto en forma de enzimas aisladas o sistemas celulares ha sido de vital importancia.

Los grandes progresos realizados en los estudios a nivel molecular de los mecanismos de actuación de muchos compuestos, han revelado la importante influencia de la quiralidad en la efectividad de muchas moléculas. Una gran variedad de funciones biológicas tienen lugar a través de mecanismos de reconocimiento molecular, lo que requiere un perfecto acoplamiento entre el receptor y el ligando. En los sistemas biológicos, las enzimas y receptores son capaces de diferenciar los dos enantiómeros de un compuesto racémico a través de las diferentes uniones establecidas, lo que supone también una diferencia en la actividad de cada enantiómero. La quiralidad es un factor determinante en la eficacia de muchos fármacos, aditivos y otros productos químicos. En general, sólo uno de los enantiómeros, el eutómero, presenta la actividad biológica deseada; el otro isómero (o distómero) presenta diferente actividad; en algunos casos es inocuo para el organismo, pero en otros muchos puede inhibir el efecto del eutómero, o presentar otra actividad, dañina para el organismo (1), como ocurre en el conocido caso de la Talidomida (el enantiómero *R* presenta la actividad deseada contra los mareos y vómitos de mujeres embarazadas, mientras que el enantiómero *S* es teratígeno). En otros casos, los 2 enantiómeros presentan otras diferencias, como ocurre con el edulcorante artificial Aspartamo: un enantiómero es dulce y sin embargo el otro es amargo (2).

Por todo ello, la fabricación de la forma activa (enantiómero puro) de muchas sustancias se ha convertido en uno de los objetivos primordiales de la industria farmacéutica y agroalimentaria. La síntesis de compuestos ópticamente activos juega

un papel de gran relevancia en la obtención de nuevos principios activos quirales, así como en la obtención de intermedios sintéticos.

Las tres principales metodologías a partir de las cuales se pueden obtener compuestos ópticamente activos son las siguientes: *i)* utilización de precursores quirales; *ii)* resolución cinética de mezclas racémicas mediante métodos físicos, catalizadores químicos o enzimáticos y *iii)* síntesis asimétrica, utilizando auxiliares químicos o biocatalizadores.

Actualmente, no sólo existe un gran interés en el diseño y descubrimiento de compuestos enantioméricamente puros, sino también en el desarrollo de nuevos procesos sintéticos a escala industrial, para permitir procesos más económicos y ambientalmente sostenible. Entre las diferentes metodologías para la obtención de enantiómeros puros cabe destacar la creciente importancia de la biocatálisis. En los últimos años, se ha producido un gran aumento en la utilización de enzimas y microorganismos en la transformación de múltiples sustratos con elevada quimio-, regio- y enantioespecificidad (3). Las enzimas son por naturaleza materiales quirales, por lo que pueden ser obtenidas sustancias ópticamente activas con un elevado exceso enantiomérico, a partir de mezclas racémicas o sustratos proquirales, o mediante transformaciones asimétricas. Tradicionalmente, estos productos se han obtenido a través de semi-síntesis, mediante la modificación de productos ya existentes, o a través de síntesis completas, lo que implica rutas sintéticas muy largas y en ocasiones difíciles de escalar. El desarrollo de procesos biocatalíticos en las dos últimas décadas, ha permitido su inclusión en procesos sintéticos, facilitando y simplificando esas rutas (4).

El número de procesos biocatalíticos llevados a cabo en la industria ha aumentado considerablemente en los últimos años, principalmente en el sector farmacéutico o en la fabricación de productos de alto valor añadido (5). Las enzimas utilizadas como catalizadores de reacciones orgánicas se pueden dividir en seis grupos (6): oxidorreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas. La mayoría de los procesos biocatalíticos se desarrollan con la utilización de hidrolasas (60 %), seguido de oxidorreductasas (25 %); los otros 4 grupos de enzimas constituyen el 15 % restante (Figura 1), pero adquiriendo cada vez mayor importancia, como ocurre con las liasas, formadoras de enlace C-C (7).

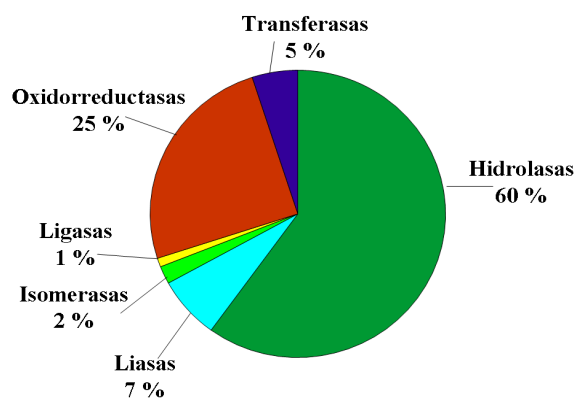


Figura 1.- Frecuencia del uso de las diversas enzimas como catalizadores químicos.

La utilización de biocatalizadores en síntesis presenta una serie de ventajas (8):

1. Son catalizadores eficientes, que actúan en intervalos de temperatura moderada (20-40°C) y presión atmosférica, minimizando los problemas de epimerización, racemización e isomerización que puedan ocurrir.
2. Presentan una elevada selectividad: regio-, quimio- y enantioselectividad.
3. Su actividad no queda restringida a sus sustratos naturales, sino que admiten una gran variedad de sustratos.
4. Pueden catalizar un extenso abanico de reacciones, incluso llevar a cabo reacciones que químicamente no se podría, sobre grupos no activados del sustrato.
5. Principalmente las hidrolasas, presentan actividad catalítica en medios orgánicos, lo que permite la transformación de sustratos hidrofóbicos.
6. Los biocatalizadores pueden ser inmovilizados, lo que aumenta su actividad en determinados casos, y reutilizados en diferentes ciclos.
7. Las reacciones biocatalizadas son altamente compatibles con el medio ambiente, cumpliéndose los principios de la Química Sostenible (9).
8. Contribuyen al desarrollo de procesos ambientalmente benignos para la obtención de productos de alto valor añadido.
9. Los biocatalizadores son biodegradables.
10. Las enzimas pueden ser sobreexpresadas, haciendo los procesos biotecnológicos económicamente eficientes. La sostenibilidad de un proceso incluye la energía y materia prima utilizadas, las pérdidas de rendimiento con

productos secundarios, la seguridad del proceso y la calidad del producto. Ya existen numerosos procesos biocatalíticos establecidos en la industria, que han proporcionado una mejora de estos aspectos, lo que implica también una mejora económica del proceso y mayor competitividad (5c).

Frente a estas ventajas, la utilización de enzimas o de células enteras también presenta limitaciones. Muchas presentan actividad en un rango estrecho de pH y temperatura, pudiendo desactivarse fácilmente fuera de esos límites. La gran mayoría son susceptibles de sufrir inhibición por el sustrato o por el producto. Su actividad natural se lleva a cabo en medios acuosos, por lo que algunas pueden ser desactivadas en medios orgánicos. Existen diferentes técnicas para superar estas limitaciones y aumentar la eficacia de los biocatalizadores, como la alteración del medio de reacción (10) o la inmovilización del catalizador (11). En los últimos años, gracias a los avances en biología molecular, ingeniería genética y bioinformática, se están desarrollando técnicas tales como procesos de evolución dirigida, mediante los que se consiguen biocatalizadores más específicos, aumentando su actividad, su resistencia y su enantioselectividad, que incluso puede ser cambiada (12). Todo esto hará que en un futuro se incremente enormemente la implementación de procesos biocatalíticos en la industria.

2. BIOTRANSFORMACIONES CATALIZADAS POR HIDROLASAS

Las hidrolasas constituyen, con diferencia, el grupo más extenso de catalizadores químicos utilizados en la industria farmacéutica. Son un grupo grande de enzimas que se clasifican en función del tipo de enlace que hidrolizan. La función natural de la mayoría de las hidrolasas es digestiva, ya que convierten los alimentos en unidades más pequeñas para la digestión. Por ejemplo, las proteasas hidrolizan las proteínas a péptidos más pequeños y luego a aminoácidos, las lipasas hidrolizan los lípidos (triglicéridos) a glicerol y ácidos grasos etc.

Tres características hacen a las hidrolasas útiles para el químico orgánico. En primer lugar, presentan una amplia especificidad de sustratos; además las hidrolasas suelen aceptar como sustratos diferentes intermedios sintéticos. En segundo lugar, presentan una alta estereoselectividad, incluso sobre sustratos no naturales y tercero, también catalizan otras reacciones, además de la hidrólisis, como

condensaciones (hidrólisis reversa) y alcoholisis (utilizar un alcohol en lugar de agua). Además, poseen otras características que hacen a las hidrolasas biocatalizadores útiles para la síntesis orgánica. Muchas hidrolasas están disponibles comercialmente, no requieren cofactores y toleran la adición de disolventes miscibles con el agua (por ejemplo, DMSO, DMF). Las lipasas, esterasas y proteasas también son estables y activas en un gran número de otros disolventes orgánicos más hidrofóbicos.

Las enzimas se clasifican por un número de la Comisión Europea (CE) en función del tipo de reacción que cataliza. En esta clasificación las hidrolasas pertenecen al grupo 3 y éstas a su vez se clasifican según el tipo de enlace que hidrolizan (Tabla I).

Tabla I. Hidrolasas útiles en síntesis orgánica.

Número EC	Tipo de enlace que hidrolizan	Ejemplos
3.1	Éster	Lipasas
3.1.1	Ésteres de ácido carboxílico	
3.2	Glicosídico	α-Amilasa; β-Galactosidasa
3.2.1	O-glicosídico	
3.3	Éter	Epoxidohidrolasa
3.3.2	Epóxidos	
3.4	Peptídico	Subtilisina; Tripsina
3.4.16.21	Serin proteasa	
3.4.17.24	Metalo proteasa	
3.5	Otras amidas	Termolisina
3.5.1	Amidas lineales	
3.5.2	Amidas cíclicas	
3.5.3	Nitrilos	

A continuación comentaremos la aplicación de las hidrolasas más utilizadas (lipasas y proteasas) en la producción a nivel industrial en la obtención de fármacos o sintones para la posterior preparación de los mismos y en los que se aprovechan la regio y estereoselectividad de las hidrolasas.

2.1. Lipasas

Las lipasas (EC 3.1.1.3), son enzimas pertenecientes al grupo de hidrolasas, que catalizan la hidrólisis de ésteres formados a partir de glicerol y ácidos grasos de cadena larga, de una forma regio- y enantioselectiva. Dada su estabilidad en medios orgánicos, el hecho de que no requieran cofactores, su elevada regio-, quimio- y enantioselectividad y el amplio espectro de sustratos que pueden transformar (13), son en muchas ocasiones el biocatalizador de elección en la preparación de

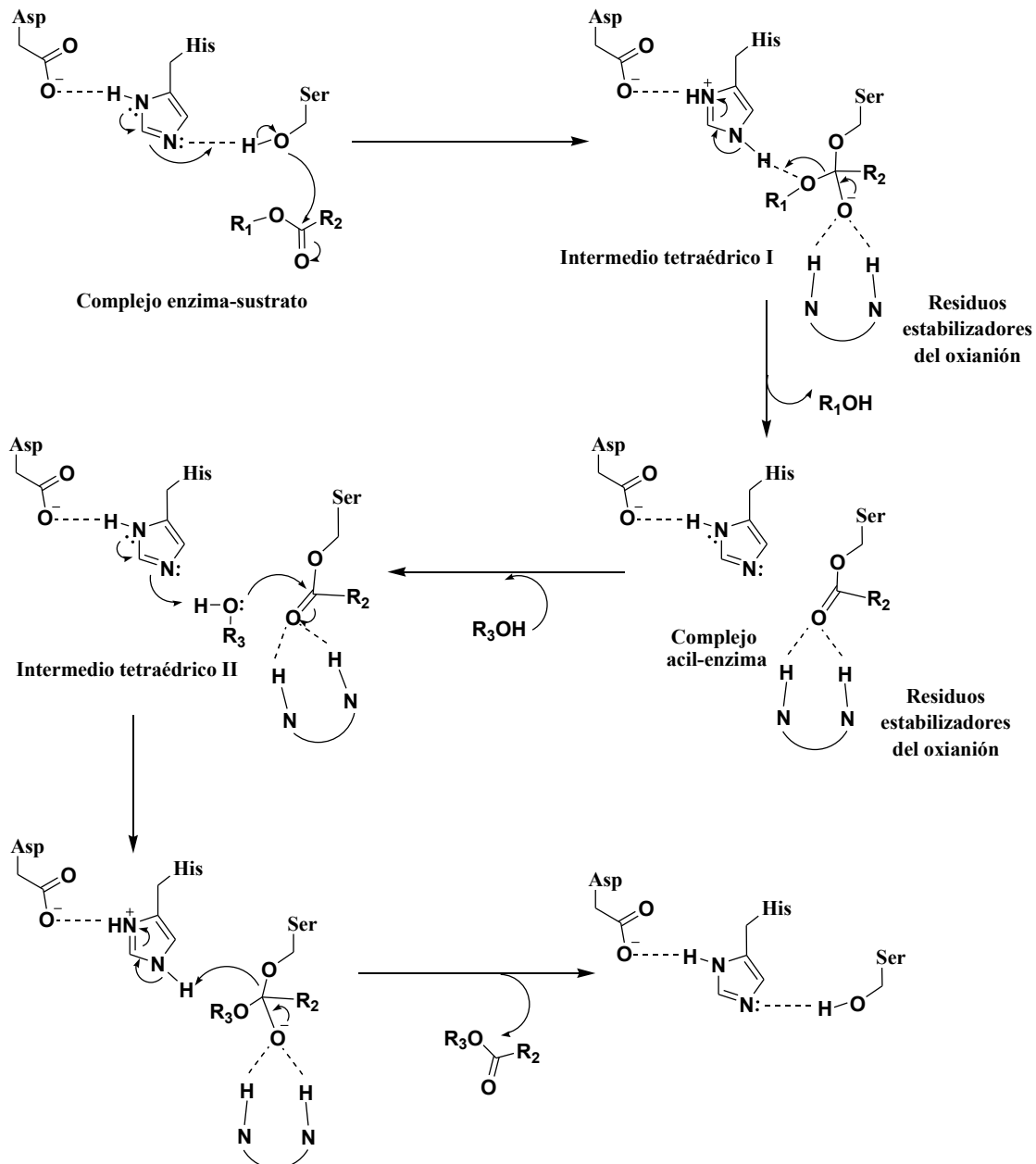
moléculas orgánicas quirales. Son las enzimas que mayoritariamente se emplean en procesos de resolución cinética de mezclas racémicas de alcoholes, ácidos, ésteres y aminas. Se utilizan preferentemente en la resolución de alcoholes secundarios (14), mediante procesos de hidrólisis de los correspondientes ésteres o procesos de transesterificación, por la elevada enantioselectividad que presentan frente a este tipo de sustratos. Se podría resumir que la enantioselectividad del proceso dependerá del origen de la lipasa, la estructura del sustrato y las condiciones experimentales de la reacción.

La versatilidad de estas enzimas hace que sean capaces de llevar a cabo también la hidrólisis de otros sustratos no naturales, así como la síntesis en medio orgánico de ésteres y otros compuestos. El mecanismo catalítico de las lipasas (desarrollado en el Esquema 1) es similar al descrito para las serín-proteasas (15), estando implicados los aminoácidos que conforman la triada catalítica, con las siguientes etapas:

1. El sustrato (R_1COOR_2) accede al centro activo de la enzima (complejo enzima-sustrato), situándose de forma que el carbono carbonílico es atacado por la serina catalítica, a través de su grupo hidroxilo activado. Esta activación se produce por la colocación especial de los tres aminoácidos catalíticos, que provoca una disminución del valor de pK del grupo hidroxilo de la serina: el protón del grupo $-OH$ de la serina es captado por el nitrógeno N_ϵ del anillo imidazólico de la His del centro activo, cuya carga positiva es estabilizada por el aspartato (o glutamato) que forma parte de la triada. Se forma así, el primer intermedio tetraédrico (I). La carga negativa, en principio situada en el oxígeno O_γ de la serina, sufre una translocación hacia el oxígeno del grupo carbonilo, originándose un oxianión, el cual es estabilizado a través de la formación de uno o varios puentes de hidrógeno con los aminoácidos que constituyen el “*hueco oxianiónico*”.
2. El intermedio tetraédrico se rompe al transferirse al oxígeno del alcohol saliente, el protón previamente cedido a la His, liberándose el alcohol y formándose el complejo acil-enzima.
3. Se produce un segundo ataque nucleofílico por parte del segundo sustrato R_3OH (H_2O en sistemas biológicos), previa activación similar a la descrita en el

apartado 1, sobre el carbono carbonílico del complejo acil-enzima, formándose un nuevo intermedio tetraédrico (II).

- El intermedio tetraédrico II colapsa tras la cesión al oxígeno de la serina del H captado por la His a partir del nucleófilo atacante, liberándose el producto (un ácido graso como producto natural) y regenerándose la serina catalítica.

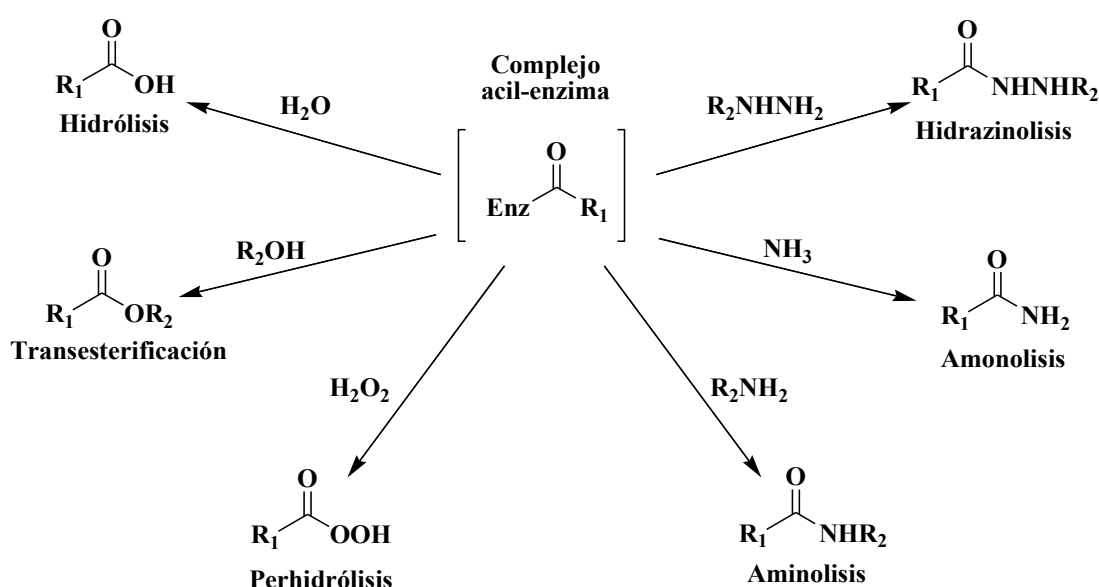


Esquema 1.- Mecanismo de hidrólisis de las lipasas.

Si el nucleófilo R_3OH es agua, la lipasa llevará a cabo la hidrólisis del éster sustrato, pero en un entorno con baja actividad de agua otros nucleófilos pueden competir con el agua en el ataque al intermedio acil-enzima, dando lugar a diferentes

productos. Esta versatilidad es utilizada en biotransformaciones para llevar a cabo distintos procesos (Esquema 2):

- Procesos de transferencia de acilo, en los que el ataque de un alcohol conduciría a la formación de ésteres (16).
- Procesos de aminólisis, como consecuencia del ataque de una amina, dando lugar a la formación de amidas (17).
- Procesos de amonólisis, si el nucleófilo utilizado es NH_3 (18).
- Formación de perácidos, cuando el peróxido de hidrógeno actúa como nucleófilo (19).
- Hidrazinólisis, actuando como nucleófilo una hidracina (20). La actuación como nucleófilo de una hidroxilamina dará lugar a la formación de derivados de ácido hidroxámico (21).



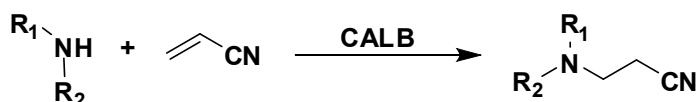
Esquema 2.- Reacciones catalizadas por las lipasas.

En este contexto se engloba el concepto de “*promiscuidad*” de las lipasas y de las enzimas en general, referido a la capacidad de estos biocatalizadores de llevar a cabo diferentes transformaciones químicas sobre un amplio número de sustratos, naturales o no (22).

Hule y Berlung (23), establecen tres tipos de *promiscuidad* enzimática, debidas a: i) las condiciones de reacción, ii) la variedad de sustratos y iii) la actividad catalítica

de la enzima. En el primer tipo, algunos autores incluirían la capacidad de muchas enzimas de presentar actividad en su medio no convencional, como es el caso de las lipasas en disolventes orgánicos. El segundo tipo de promiscuidad, se refiere al amplio rango de sustratos que pueden ser aceptados por las enzimas, como las lipasas, tal y como se ha descrito anteriormente. El mecanismo de acción sobre estos sustratos es similar en todos ellos, formándose un estado de transición equivalente al que se formaría con un sustrato natural. En este grupo, también se incluyen aquellos mutantes con los que se han obtenido enzimas capaces de tolerar un mayor número de sustratos que la enzima nativa, o con estereoselectividad opuesta, como en el caso de la lipasa de *Candida antarctica*, isoforma B (CALB), cuya enantioselectividad fue transformada por Magnusson y cols. (24), pasando a ser S-selectiva en lugar de R-selectiva. De esta forma, mediante las diversas técnicas de biología molecular, a través de las cuales se obtienen diferentes mutantes enzimáticos, se está logrando la obtención de biocatalizadores activos frente a un mayor rango de sustratos (25) y más enantioselectivos (26).

Por último, el último tipo de *promiscuidad* enzimática mencionado, se refiere a la capacidad del sitio activo de las enzimas de catalizar más de una transformación química. Algunos investigadores han desarrollado otro tipo de reacciones, mediante el aprovechamiento de la maquinaria catalítica de las lipasas: el grupo de Gotor ha demostrado cómo se puede llevar a cabo una reacción de adición de Michael catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica*, a partir de acrilonitrilo y diferentes aminas secundarias (Esquema 3) (27).



Esquema 3.- Reacción de adición de Michael catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica* (27).

Así mismo, en la bibliografía aparecen descritas otras innovadoras aplicaciones sintéticas de lipasas, como son las reacciones de formación de enlace C-C catalizadas por mutantes de CALB (mutantes Ser105Ala y Ser105Gly), que mostraron actividad aldolasa (28). También se demostró esta actividad en la lipasa nativa, pero en menor grado.

Recientemente, se ha demostrado que también algunas enzimas pueden llevar a cabo nuevas transformaciones químicas, en las que estaría implicado un centro catalítico diferente al que normalmente interviene en la actividad catalítica de la enzima (29).

Esta gran habilidad de las enzimas de presentar actividad frente a un amplio rango de sustratos, bajo diferentes condiciones, así como la mejora de biocatalizadores que se está logrando a través de ingeniería genética, supone un gran potencial en su aplicación en un amplio número de metodologías sintéticas.

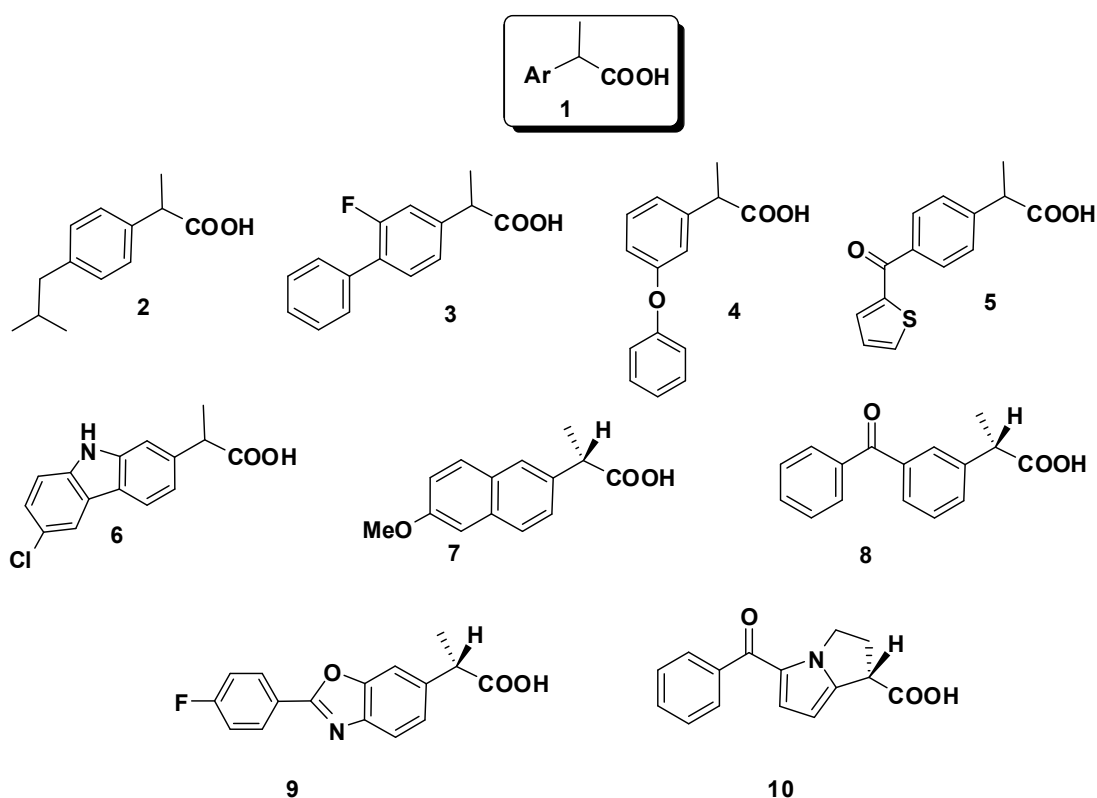
Dentro de las diversas aplicaciones de las lipasas en el campo de las biotransformaciones, en este capítulo nos centraremos en algunos ejemplos dónde se utilizan lipasas de diferentes orígenes en la obtención de compuestos de interés para la industria farmacéutica.

■ 2.1.1. Lipasa de *Candida cylindracea* o *Candida rugosa*

La lipasa de *Candida rugosa*, también conocida como *Candida cylindracea* es una de las más utilizadas en biotransformaciones (30). Se conoce su estructura tridimensional (31) y se comercializa en diferentes preparados enzimáticos que contienen un porcentaje proteico bajo (aproximadamente un 16 % de proteínas) (32). Estos preparados se diferencian en la actividad enzimática pero no en la estereoselectividad de esta lipasa (33).

Existen numerosos ejemplos industriales dónde se usa esta lipasa para la obtención de productos de interés farmacéutico. Uno de estos, son los antiinflamatorios no esteroídicos, también conocidos como los profenos (ácidos 2-arilpropiónicos, de estructura genérica **1** (Esquema 4) tienen una gran importancia. Entre ellos, citaremos el Ibuprofeno **2**, Flurbiprofeno **3**, Fenoprofeno **4**, Suprofeno **5**, Carprofeno **6**, Naproxeno **7**, Dexketoprofeno **8**, Flunoxaprofeno **9** o el Ketorolaco **10**. Estos fármacos, se suelen utilizar en gran número de procesos inflamatorios y especialmente en el tratamiento de las enfermedades reumatoides e incluyen una serie de procesos tales como artrosis, artritis reumatoide, dolores en columna vertebral, lumbago, etc., los cuales son responsables de una alta incidencia de bajas laborales. La actividad de estos fármacos está asociada a su capacidad de inhibir la ciclooxigenasa, responsable de la biotransformación del ácido arquidónico hasta prostaglandinas o tromboxanos (34). Numerosos estudios farmacológicos acerca de

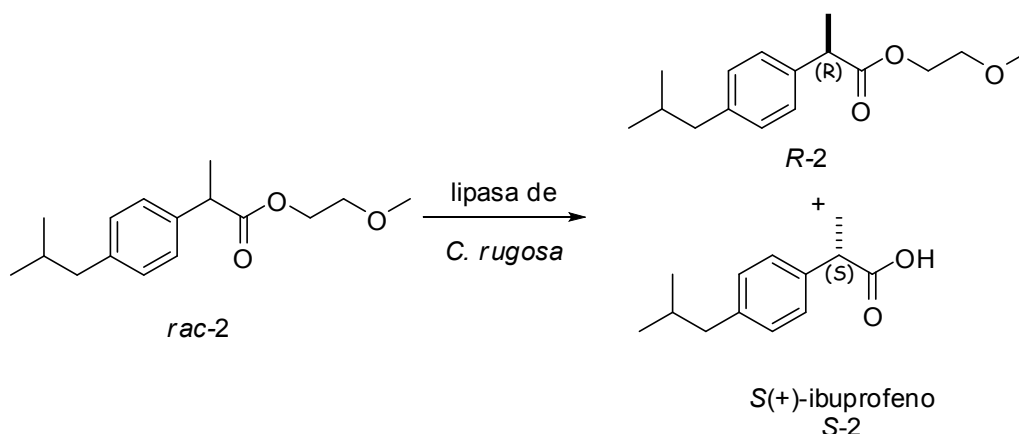
la actividad terapéutica de los dos enantiómeros de estos compuestos han demostrado que el isómero S(+) no sólo tiene un mayor poder antiinflamatorio -28 veces en el caso del Naproxeno (35) o 160 veces para el S(+) Ibuprofeno- frente al su antípoda R(-) (36), el cual es esencialmente inactivo como inhibidor de la síntesis de prostaglandinas (37), aunque puede tener efecto analgésico por mecanismos diferentes (38), sino que también el eutómero S(+) alcanza su concentración terapéutica en sangre antes que el racemato (39). No obstante, sólo el Naproxeno **7**, Dexketoprofeno **8**, Flunoxaprofeno **9** y el Ketorolaco **10** se venden como enantiómeros puros, mientras que el más vendido de todos, el Ibuprofeno **2**, se comercializa como racémico.



Esquema 4.- Estructura de los antiinflamatorios no esteroideos más utilizados.

De entre las diferentes metodologías descritas para la obtención enantioselectiva del eutómero S de estos compuestos, la utilización de lipasas que catalicen, bien la hidrólisis enantioselectiva de derivados racémicos de los profenos, bien la esterificación enantioselectiva de los mismos, resulta una interesante alternativa. La compañía norteamericana Pfizer ha desarrollado un proceso industrial para la obtención del eutómero S(+)-Ibuprofeno **S-2** partiendo de una mezcla

racémica del correspondiente éster metoxietílico **rac-2** (Esquema 5), catalizado por la lipasa de *C. rugosa* inmovilizada en los poros de un reactor de membrana (40).



Esquema 5.- Obtención del S(+)-ibuprofeno (S-2) por hidrólisis del éster racémico rac-2.

La reacción se lleva a cabo a una temperatura de 20°C, y a pH= 5, puesto que, aunque la lipasa muestra actividad en un amplio intervalo de valores de pH, se necesita un medio ácido para que disminuya la solubilidad del Ibuprofeno, puesto que la enzima se inhibe por exceso de producto. El principal inconveniente del proceso -la baja solubilidad de los productos en medio acuoso (por debajo de 1mM para el **rac-2**), que implicaría operar con reactores de gran volumen-, se elimina trabajando en un reactor de fibra hueca, donde la lipasa está atrapada no covalentemente en los poros de una membrana que separa un sistema bifásico agua-disolvente orgánico. Así, el sustrato **rac-2** se disuelve en la fase orgánica, y se circula por el exterior de la membrana, donde es convertido por la enzima y el correspondiente ácido se extrae a la fase acuosa. Posteriormente, un segundo reactor de membrana, fijado a un pH alto, permite la separación del producto **S-2** del enantiómero del éster que no ha reaccionado, **R-2**, el cual puede recircularse, lo que permite alcanzar altas productividades volumétricas (40).

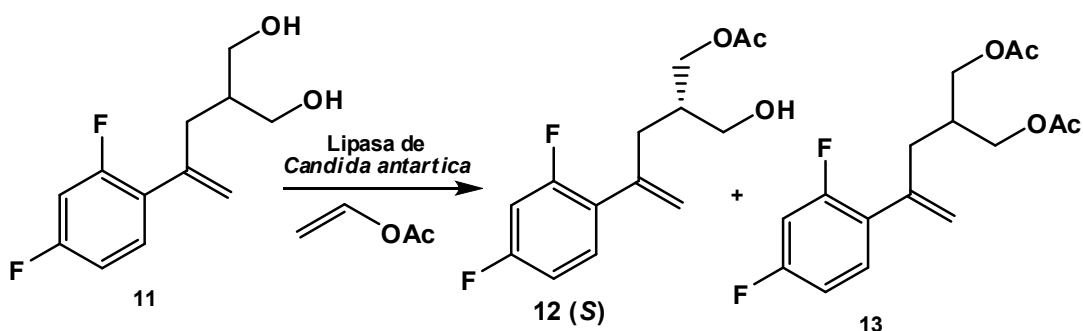
2.1.2. Lipasa de *Candida antarctica*

Es una de las lipasas más versátiles empleada en el campo de las biotransformaciones. Existen dos isoenzimas de esta lipasa, la forma A y la forma B, que presentan ciertas diferencias (41). La lipasa A (CALA) es dependiente de Ca^{2+} y más termoestable, mientras que la lipasa B (CALB) es menos termoestable y no dependiente de metales para su actividad. Su especificidad de sustrato presenta grandes diferencias, ya que la CALB es muy activa frente a gran variedad de

sustratos no naturales, mientras que la CALA tiene una menor versatilidad. Ambas isoenzimas han sido obtenidas en forma pura a través de procesos de clonación y sobreexpresión en *Aspergillus oryzae*. Para aplicaciones preparativas CALB ha sido mucho más utilizada (42).

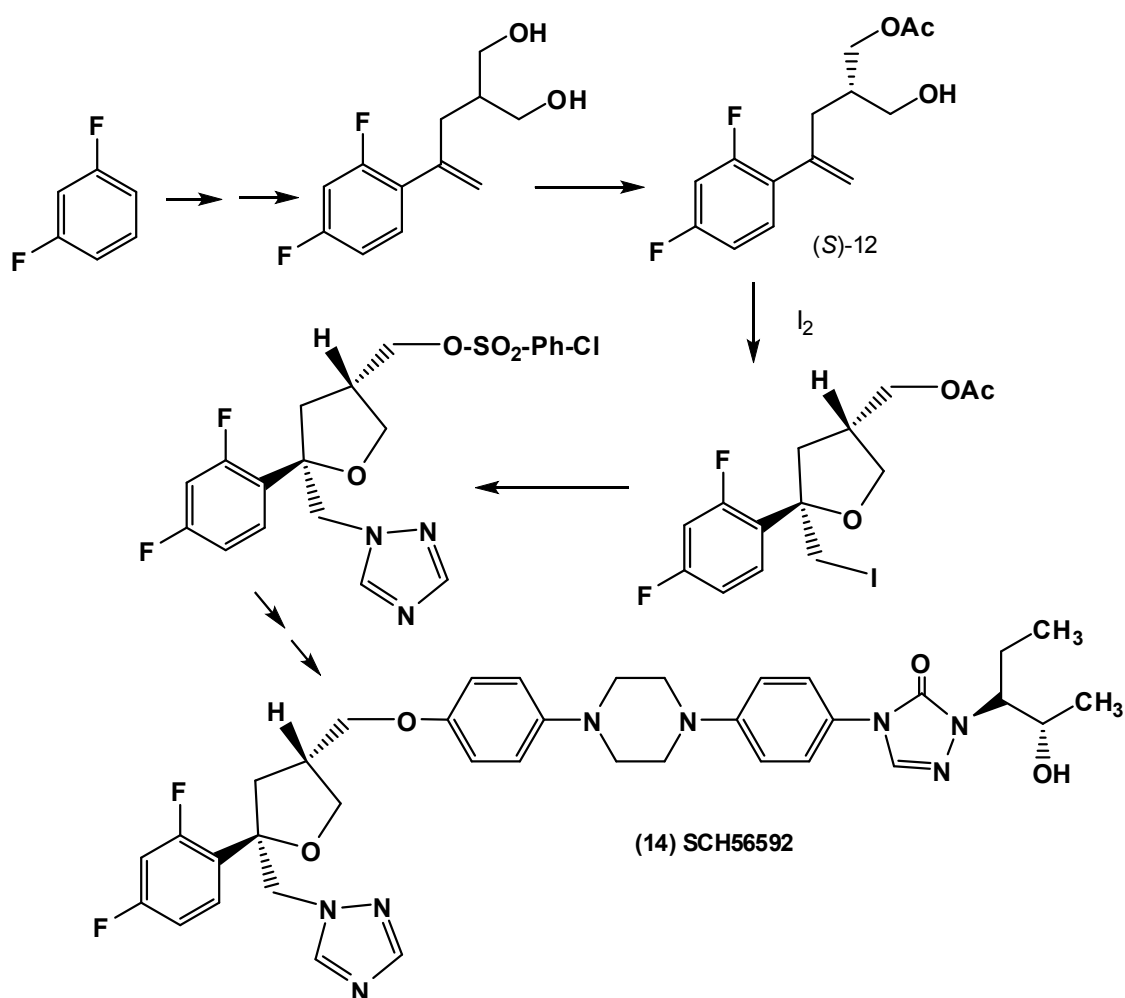
La estructura tridimensional de la CALB libre ha sido resuelta mediante difracción de rayos X (43). La CALB se presenta en diferentes preparados comerciales que difieren en el soporte sobre el que se incorpora el enzima. Uno de los preparados comerciales más empleado es el comercializado por Novo Nordisk como “Novozym 435”, donde la enzima está soportada en una resina conocida como “Lewatit E”. Una de las ventajas de este preparado es que es más estable que el enzima nativo (44).

La compañía Shering Plough ha desarrollado un proceso industrial para la obtención del sintón quiral (**12, S**) (Esquema 6), clave en la síntesis de un potente antifúngico (compuesto SCH56592, **14**) (Esquema 7) utilizando la lipasa de *Candida antártica* Novozym 435 (45) y el acetato de vinilo como agente acilante. Esta enzima es capaz de llevar a cabo la acilación regioselectiva del compuesto **11** para obtener el compuesto monoacilado **12** de forma estereoselectiva y el compuesto diacilado **13** (Esquema 6). Esta reacción se lleva a cabo a una temperatura de 0°C usando acetonitrilo como medio de reacción, ya que la siguiente reacción de iodociclación para la obtención del fármaco también se lleva a cabo en este mismo disolvente. La enzima es eliminada del medio de reacción tras una simple filtración y la mezcla de reacción es directamente llevada al siguiente paso químico del bioproceso (Esquema 7).



Esquema 6.- Obtención del sintón quiral **12 (S)** por acilación quimio y regioselectiva del éster racémico **11**.

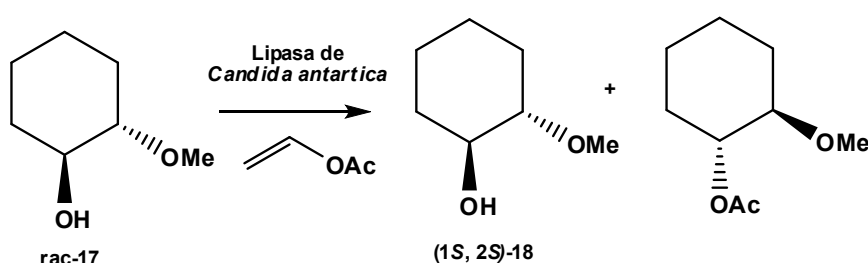
El compuesto SCH56592 (**14**) es un potente antifúngico desarrollado por Schering que presenta una gran actividad en infecciones sistémicas producidas por *Candida pulmonary* y *Aspergillus*. El aumento de la actividad de este compuesto con respecto a otros antifúngicos que también presentan un grupo triazol en su estructura es debida a la presencia del anillo de tetrahydrofurano, el cual sustituye a un anillo de 1,3-dioxolano presentes en otros azoles (46). La ruta sintética para el producto final transcurre a través de una intermedio clave que es el (2*R*, 4*S*)-fenilsulfonato, que posee la estequiometría necesaria en las posiciones 2- y 4- en el anillo de tetrahydrofurano, obtenida gracias a la iodociclación del monoéster quiral (S)**12**, seguida por el desplazamiento del iodo por el anillo de triazol.



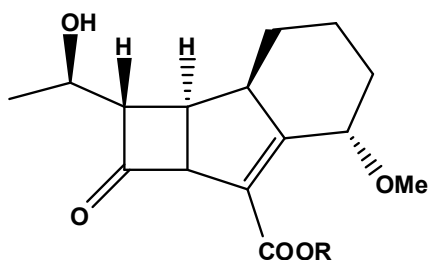
Esquema 7.- Síntesis quimioenzimática del antifúngico SCH56592.



quiral utilizado en la síntesis de nuevos antibióticos β -lactámicos que presentan una estructura tricíclica (Esquema 10). El proceso enzimático fue llevado a cabo en reactor tipo batch, usando la lipasa de *Candida antarctica* comercializada por Novo Nordisk como Novozym 435 a temperatura ambiente y usando ciclohexano como medio de reacción. De esta forma, se consigue aislar el compuesto **1S,2S-18** con un rendimiento del 36 % y 99 % de exceso enantiomérico, con una pureza del 99 %.



Esquema 9.- Hidrólisis enantioselectiva de rac-17 utilizando la lipasa de *Candida antarctica* para la obtención del síntón quiral **1S,2S-18**.



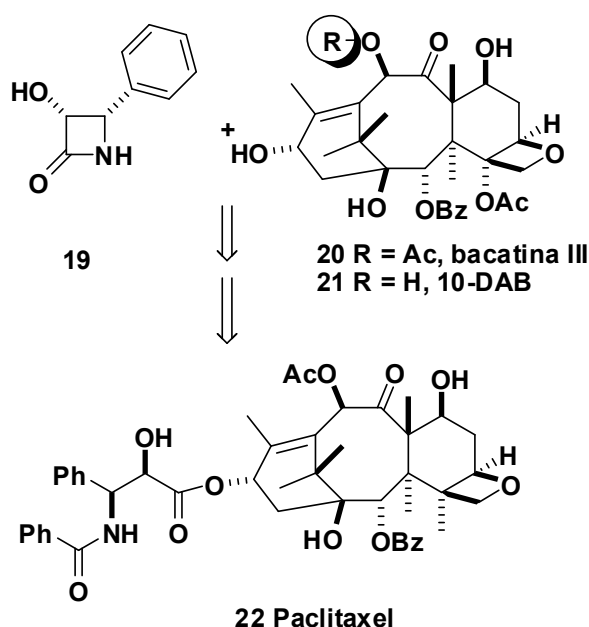
Esquema 10.- Estructura de nuevo antibióticos β -lactámicos tricíclicos.

2.1.3. Lipasa de *Pseudomonas cepacia*

Esta lipasa, al igual que otras aisladas pertenecientes a la especie *Pseudomonas*, ha sido empleada con alta selectividad tanto en reacciones de hidrólisis y alcoholisis de ésteres y anhídridos, como en procesos de transesterificación de alcoholes. La estructura de rayos X de su conformación abierta ha sido elucidada, presentando la típica estructura de α/β -hidrolasa (50). Parece que esta lipasa

presenta un centro activo mucho más estrecho que otras lipasas, ya que en ciertos casos presenta inconvenientes para acomodar sustratos muy voluminosos.

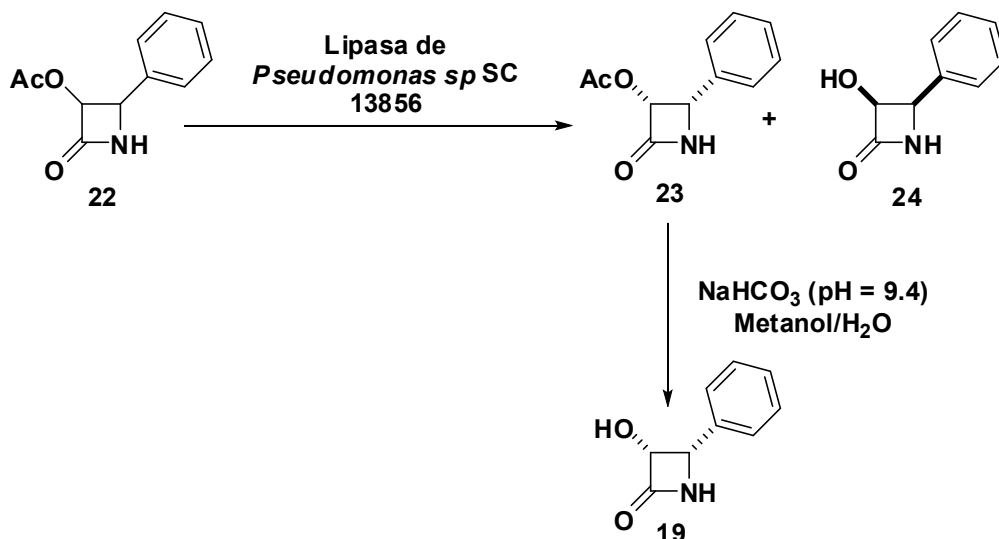
El Paclitaxel (Taxol) es un agente antimetastático, utilizado en el tratamiento de varios tipos de cáncer entre los que podemos citar el cáncer de ovarios y de cáncer de mama (51). El Paclitaxel fue originalmente aislado de la corteza del tejo *Taxus brevifolia* y también se ha encontrado en otras variedades de tejo. El principal inconveniente es que el rendimiento es muy bajo (0,07%). Se ha estimado que son necesarias unas 20.000 libras de corteza de tejo (equivalente a 3.000 árboles) para producir 1 Kg de Paclitaxel (52). El desarrollo de un proceso semisintético para la producción de Paclitaxel a partir de, por un lado, bacatina III **20** o 10-desacetilbacatina III **21** y por el otro de la estructura lactámica **19** es una muy interesante propuesta (Esquema11).



Esquema 11.- Síntesis del Paclitaxel.

Para ello, se llevó a cabo la obtención de la estructura lactámica **19** mediante la hidrólisis enantioselectiva del acetato racémico 3-(acetiloxi)-4-fenil-2-azetidina **22**. (Esquema 12) al correspondiente alcohol **23** y el *R*-acetato **24** (53) usando una lipasa PS-30 de *Pseudomonas cepacea* (Amano) y BMS lipasa (lipasa extracelular obtenida de la fermentación de *Pseudomonas sp.* SC 13856). El rendimiento de reacción

obtenido para el (R)-acetato **24** fue superior al 48 % (máximo teórico del 50 % para una resolución cinética) con un exceso enantiomérico superior al 99,5 %.



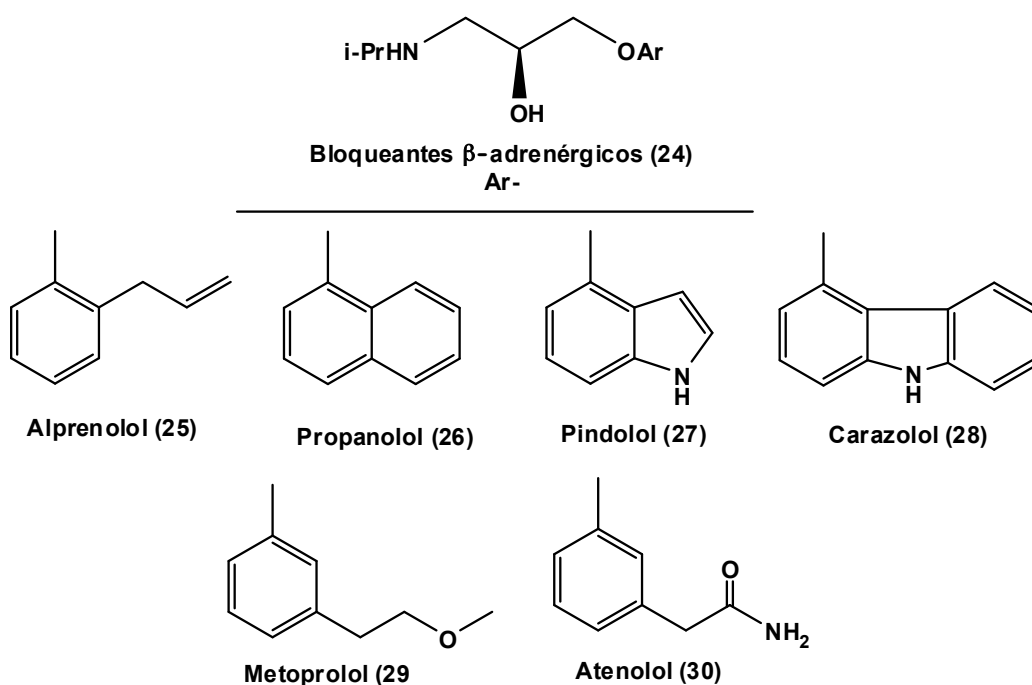
Esquema 12.- Hidrólisis enantioselectiva del acetato racémico.

Las lipasas BMS y PS-30 fueron inmovilizadas sobre polipropileno Accurel (PP), y estas se pueden reutilizar (diez ciclos) sin pérdida de actividad enzimática, productividad o enantiopureza del producto **23** en el proceso de resolución. El proceso enzimático fue escalado hasta 250 L (2,5 Kg de sustrato), usando las lipasa BMS y PS-30, respectivamente. De cada “*batch*” de reacción, se aisló el *R*-acetato **23** con un 45 % de rendimiento y 99,5 % de ee. Mediante una suave hidrólisis en medio básico, el *R*-acetato se transformó químicamente al *R*-alcohol **19**, síntón que al ser acoplado a la bacatina III **20**, tras una protección y desprotección, permite preparar paclitaxel por un proceso semisintético (54).

2.1.4. Lipasa de páncreas porcino

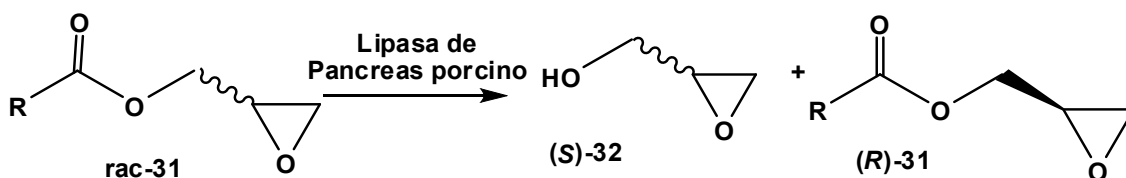
Esta lipasa es una de las más baratas y más utilizada en biotransformaciones. Se conoce su estructura terciaria y al igual que las otras lipasas mencionadas anteriormente e igualmente esta enzima se comercializa en diversos preparados enzimáticos (55).

Las ariloxipropanolaminas constituyen un extenso e importante grupo de fármacos bloqueadores β -adrenérgicos o β -bloqueantes muy utilizados en el tratamiento de la hipertensión, las arritmias, algunas formas de angina y ciertos tipos de ansiedad (**S-24-30**) (Esquema 13). Todos poseen un anillo aromático, un grupo amino terminal que presenta un sustituyente voluminoso para asegurar la afinidad por los receptores β y un carbono asimétrico en la cadena lateral, que es muy importante para el mantenimiento de sus acciones farmacológicas. La actividad β bloqueante sólo aparece en los enantiómeros (*S*). Los (*R*), son agentes estabilizantes de membrana sin actividad antagonista β . La compañía holandesa DSM ha desarrollado un proceso quimioenzimático para la preparación de estos bloqueadores β -adrenérgicos.



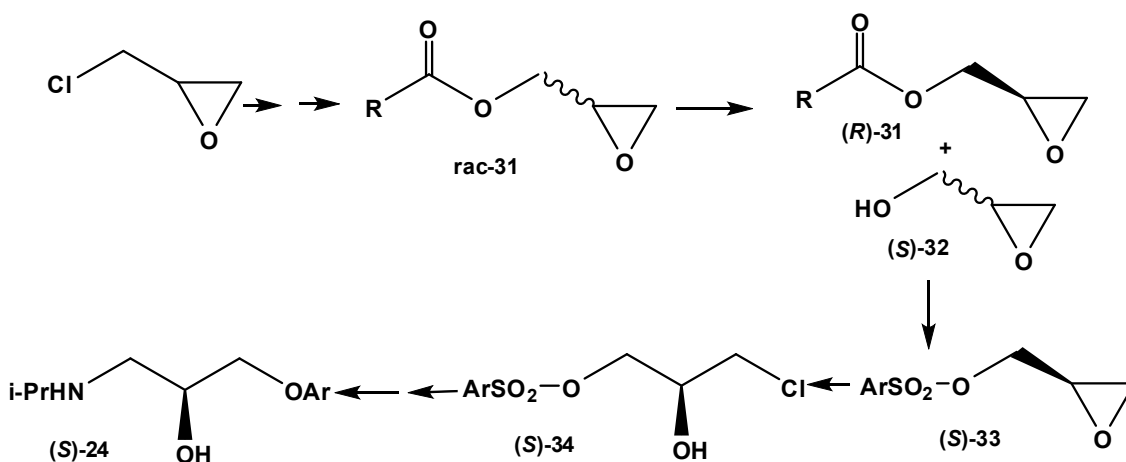
Esquema 13.- Estructura de los β -bloqueantes con estructura ariloxipropanolaminas.

En este sentido, el compuesto **S-31** es un intermedio quiral para la síntesis enantioselectiva de los fármacos β -bloqueantes (Esquema 14). La hidrólisis enantioselectiva del éster racémico **rac-31** se ha llevado a cabo con lipasa de páncreas porcino inmovilizada en un reactor de tanque agitado (56).



Esquema 14.- Hidrólisis enantioselectiva del compuesto rac-31 para la obtención del sintón quiral R-31.

En este bioproceso, se obtuvo un rendimiento superior al 85 % y un exceso enantiomérico superior al 99,9 % para la obtención del sintón quiral (**R**)-31, clave en la síntesis química de los fármacos β -bloqueantes con estructura de ariloxipropanolaminas (Esquema 15).

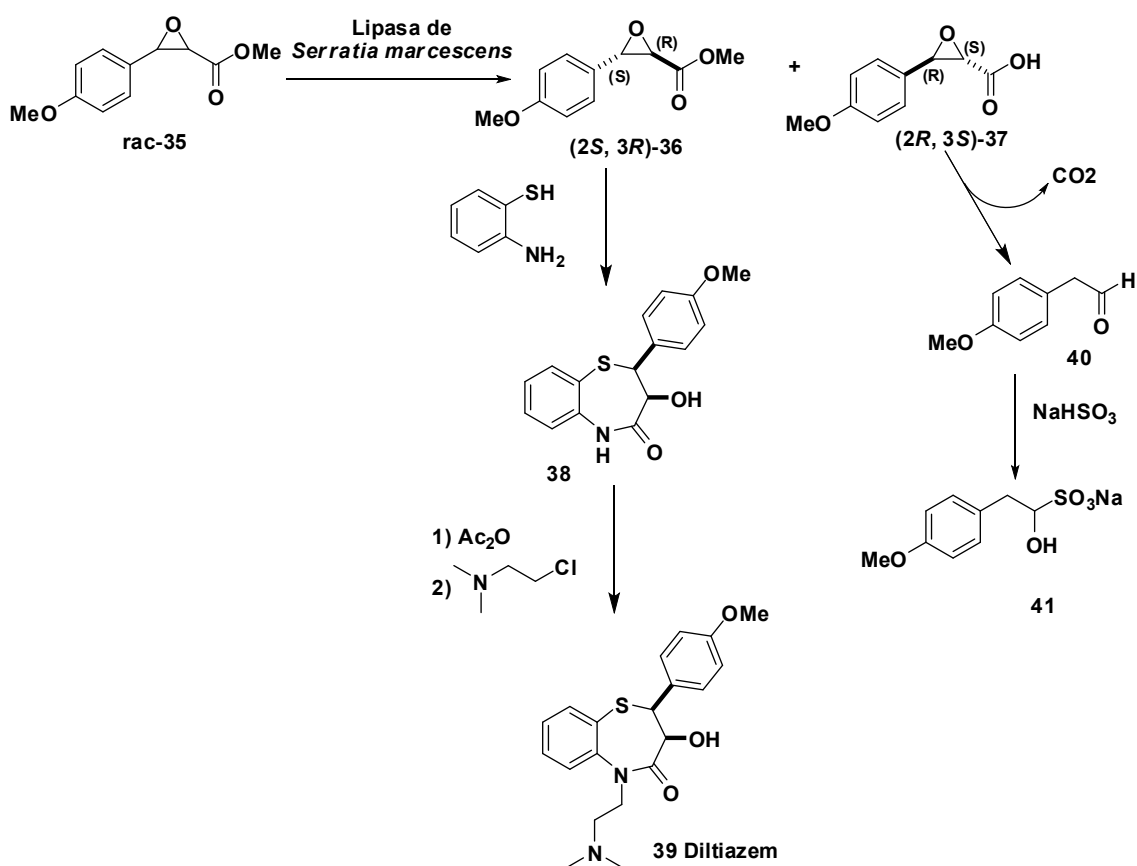


Esquema-15.- Esquema sintético para la preparación de fármacos β -bloqueantes adrenérgicos.

2.1.5. Lipasa de *Serratia marescens*

Esta lipasa es mucho menos conocida y utilizada a nivel industrial, pero cabe resaltar su uso en la obtención de un sintón quiral muy importante en la síntesis del Diltiazem (bloqueante de los canales de calcio). Los fármacos bloqueantes de los canales de calcio forman un grupo diverso, desde el punto de vista químico y

farmacológico. Desde el punto de vista químico, el diltiazem es una benzodiazepina que se usa para tratar la hipertensión y para controlar el dolor en el tórax (angina). Funciona al relajar los vasos sanguíneos para que el corazón no tenga que bombear con dificultad. También aumenta el suministro de sangre y de oxígeno al corazón. La compañía Tanabe Pharmaceutical ha comercializado una lipasa que cataliza la resolución del éster metílico correspondiente del ácido (+)-(2*S*,3*R*)-*trans*-3-(4-metoxifenil)-glicídico (MPGM) (**2*S*,3*R***)-**35** (Esquema 16), un precursor clave para el diltiazem **36** (57-60). El proceso Tanabe utiliza una lipasa secretada por *Serratia marcescens* Sr41 8000. En este caso la lipasa cataliza la hidrólisis del racémico **rac-35** para "limpiar" el enantiómero deseado (**2*S*,3*R***)-**36** del ácido producto de la hidrólisis enzimática (**2*R*,3*S***)-**37**, el cual se descompone espontáneamente al aldehído **40**.



Esquema 16. Proceso Tanabe para la preparación del síntón quiral (**2*S*, 3*R***)-**36** para la obtención del diltiazem **39**.

En el proceso Tanabe Pharmaceutical, en un reactor de membrana se combina la hidrólisis, separación y cristalización del **(2S,3R)-36**. En este sentido, el tolueno disuelve el sustrato racémico en el cristalizador y lo lleva hasta la membrana que contiene la lipasa inmovilizada. La lipasa cataliza la hidrólisis del enantiómero no deseado originando el ácido **(2R,3S)-37**, el cual pasa a través de la membrana en la fase acuosa. La espontánea descarboxilación del ácido, da el correspondiente aldehído que reacciona con el bisulfito en la fase acuosa. En ausencia de bisulfito, este aldehído desactivaría la lipasa. El enantiómero deseado **(2S,3R)-36** permanece en la fase tolueno y se lleva hasta el cristalizador. La actividad de la lipasa baja significativamente después de ocho ciclos y la membrana puede ser recargada con lipasa adicional. Con este proceso, el rendimiento del producto cristalizado **(2S,3R)-36** fue mayor del 43 % con el 100 % de pureza enantiomérica.

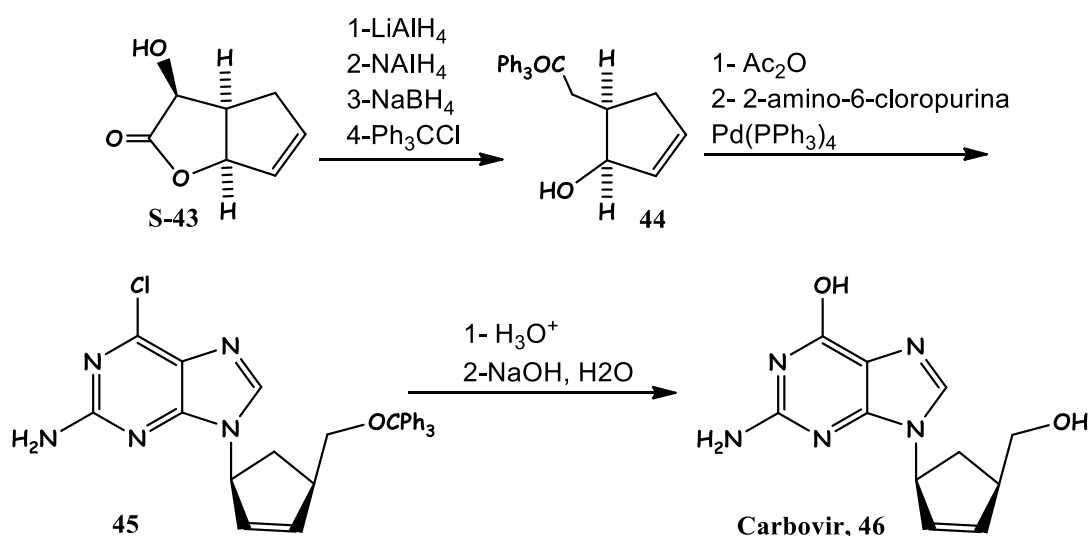
2.1.6. Lipasa de *Pseudomonas fluorescens*

La lipasa de *Pseudomonas fluorescens* también ha sido muy utilizada en la resolución de compuestos quirales. Se conoce su estructura tridimensional y presenta un peso molecular de 33 kDa (61). Una importante aplicación industrial de esta lipasa es su utilización a nivel industrial para la preparación de un sintón quiral para la obtención del Carbovir, un fármaco utilizado frente al SIDA.

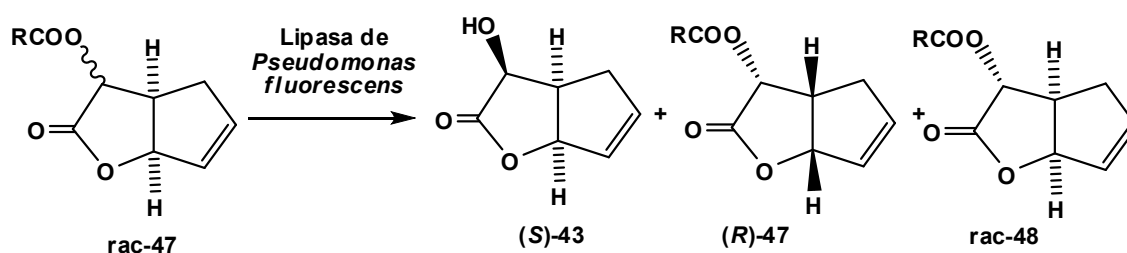
Las infecciones de origen vírico, constituyen una de las causas más importantes de mortalidad en todo el mundo. Desde finales del siglo XIX, la inmunoterapia representada por la vacunación, ha constituido la primera respuesta terapéutica eficaz contra la patogénesis viral. Sin embargo, la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), producido por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (62), un retrovirus humano del grupo de los lentivirus, orientó el tratamiento hacia otras formas terapéuticas, ya que la posibilidad de encontrar una vacuna eficaz en este caso se halla dificultada por la particular problemática que plantea el virus. Por estas razones, la terapia antivírica se basa en un conocimiento detallado del ciclo de replicación del virus y su interferencia. Por el momento, se han encontrado que los agentes antivíricos de mayor éxito actúan en la etapa de formación del provirus de ADN. Concretamente mediante la inhibición de la transcriptasa inversa, sintetizada por la célula huésped según las informaciones del ARN vírico, y que efectúa la transcripción inversa del ARN vírico en un ADN complementario, y mediante la inhibición de la proteasa. Entre los inhibidores de la

transcriptasa inversa destaca el Carbovir (63), que es un análogo de nucleósidos modificados (C-nucleósidos) que es estable, tanto a los medios ácidos como a la acción de las desaminasas, de manera que sin dejar de ser reconocidos por las quinasas celulares, y tras ser fosforilados, se enlazan a la transcriptasa inversa. La síntesis de Carbovir requiere la preparación del sintón quiral **S-43** (Esquema 17).

La compañía inglesa Celltech Group ha puesto a punto la hidrólisis enantioselectiva del compuesto **rac-47** con la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* en un reactor de tanque agitado, obteniendo el compuesto (**S**)-43 con un 22 % de exceso enantiomérico. Mediante una simple extracción se consigue separar con heptano el alcohol **S-42** que permanece en la fase acuosa y el éster en la fase orgánica (Esquema 18) (64).



Esquema 17.- Síntesis del Carbovir (46) a partir del sintón quiral S-43 Proceso Tanabe para la preparación.



Esquema 18.- Hidrólisis enantioselectiva de rac-47 utilizando la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* para obtener el sintón quiral S-43.

2.2. Proteasas

Las proteasas son enzimas proteolíticas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos. Son por tanto enzimas degradativas que hidrolizan las proteínas. Estas enzimas también son altamente estereo- y regioselectivas; normalmente actúan en condiciones suaves de reacción con un pH óptimo entre 6 y 8 en todos los casos, son fáciles de manejar, no requieren cofactores, son bastante estables y, en general, relativamente simples en su arquitectura molecular. Las proteasas representan también un grupo importante de enzimas industriales (65).

De acuerdo a la clasificación EC, las proteasas pertenecen al subgrupo 4 dentro del grupo 3 (hidrolasas). Actualmente, estas enzimas se clasifican en base a tres criterios: i) tipo de reacción que catalizan, ii) naturaleza química del centro activo y iii) relaciones evolutivas en referencia al sustrato (66). En función de los grupos funcionales del centro activo tenemos serina proteasas, aspártico proteasas, cisteína proteasas y metaloproteasas.

Las serina proteasas son las más utilizadas en el campo de las biotransformaciones y como su nombre indica se caracterizan por la presencia de una serina en el centro activo que incluye una triada catalítica de tres aminoácidos: serina (nucleófilo), aspártico (electrófilo) e histidina (base), lo cual enseguida nos recuerda a una lipasa (Esquema 2).

Las proteasas tienen una larga tradición de aplicación en la industria alimentaria (fabricación del queso, mejora de la calidad del pan, preparación de hidrolizados de proteínas de soja, reducción del amargor de hidrolizados de proteínas, síntesis del edulcorante aspartamo) y como aditivos en detergentes (65). Su aplicación en el curtido de pieles sustituyendo a los reactivos químicos tóxicos tradicionales es relativamente reciente y les ha conferido mayor importancia si cabe en la industria biotecnológica. Al igual que las lipasas las proteasas se han aplicado con éxito en la síntesis química debido, a que al igual que las lipasas, presentan una alta estereoselectividad, incluso sobre sustratos no naturales y a su capacidad para catalizar la reacción inversa a la hidrólisis en medios no acuosos. Actualmente las proteasas son un reactivo más en el laboratorio de química orgánica. Entre sus aplicaciones en este campo, destacamos la síntesis de péptidos, la catálisis de reacciones de esterificación/transesterificación y la resolución de mezclas racémicas.

Salvo la primera, el resto de aplicaciones también las comparten las lipasas. De hecho, ambas clases de enzimas se complementan en numerosos procesos de síntesis (por ejemplo al presentar regioselectividades diferentes frente al mismo sustrato).

A continuación mostraremos algunos ejemplos de la aplicación de las proteasas para la obtención de compuestos de interés farmacológico.

2.2.1. Tripsina

La tripsina es una enzima muy utilizada en la digestión de muchas proteínas, en el caso de las aplicaciones dentro de la industria farmacéutica citaremos la obtención de la insulina por métodos biocatalíticos.

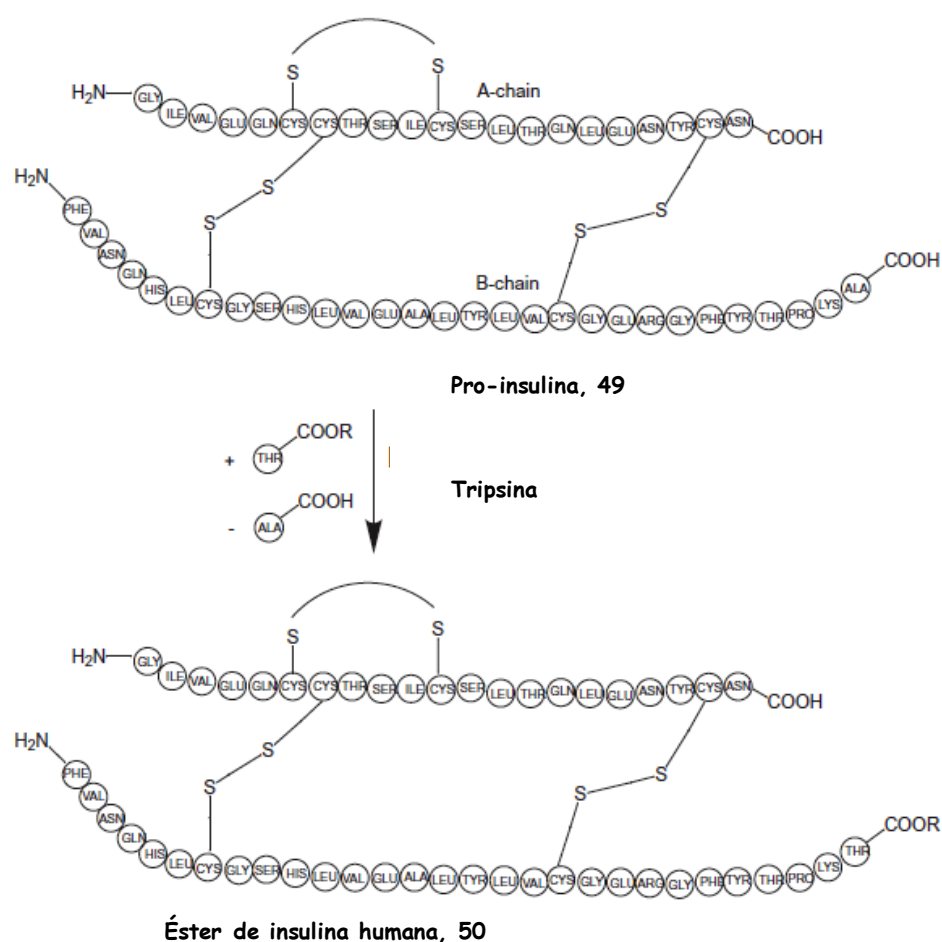
La insulina fue aislada por primera vez en 1921 a partir de páncreas de perro y su secuencia fue identificada por Sanger en 1955. La insulina es una hormona polipeptídica que se encarga de regular los niveles de azúcar en sangre y es usada para el tratamiento de la diabetes mellitus (aprox. 5% de la población occidental). La insulina está formada por dos secuencias de aminoácidos. La cadena A tiene 21 aminoácidos, y la cadena B tiene 30 aminoácidos. Las cadenas están unidas entre sí a través de los átomos de azufre de la cisteína (Cys). Las hormonas peptídicas por lo general son diferentes para cada especie, pero pueden tener similitudes. La insulina humana es idéntica a la insulina de cerdo, excepto que el último aminoácido de la cadena B del cerdo es alanina (Ala) en vez de treonina (Thr). Al ser una proteína, no puede suministrarse oralmente (proteolisis). Hoy día, existen 4 rutas para la obtención de insulina: 1) extracción de páncreas humano; 2) síntesis a partir de los aminoácidos individuales; 3) conversión de insulina porcina en humana; 4) fermentación a partir de microorganismos modificados genéticamente. En este último caso existen a su vez diferentes posibilidades para obtener insulina:

- Producción de pro-insulina, transformada en insulina por traspeptidación.
- Producción de pro-insulina usando células de *E. coli* modificadas genéticamente y posteriores pasos de síntesis y purificación.

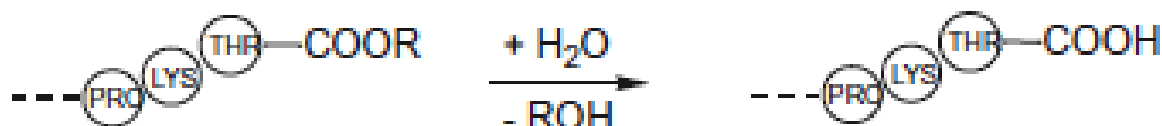
En todos estos métodos se utiliza un precursor de la insulina que es proteolíticamente estable.

PRODUCCIÓN DE PRO-INSULINA, TRANSFORMADA EN INSULINA POR TRANSPEPTIDACIÓN

En este caso, la compañía danesa Novo Nordisk ha puesto a punto la obtención de pro-insulina a través de fermentación de células de *S. cerevisiae* modificadas genéticamente (49) y posteriormente tratada con tripsina de páncreas porcino, que hidroliza el aminoácido alanina (Ala) del extremo C-terminal de la cadena B, e incorpora por traspeptidación el aminoácido treonina (Thr) en forma de éster (50) (Esquema 19). De esta forma obtenemos la insulina humana esterificada que posteriormente es hidrolizada para dar lugar a la insulina humana (67) (Esquema 20). Este proceso es llevado a cabo en un reactor de tanque agitado con una conversión del 99,9 % y un rendimiento y selectividad superiores al 97 %.



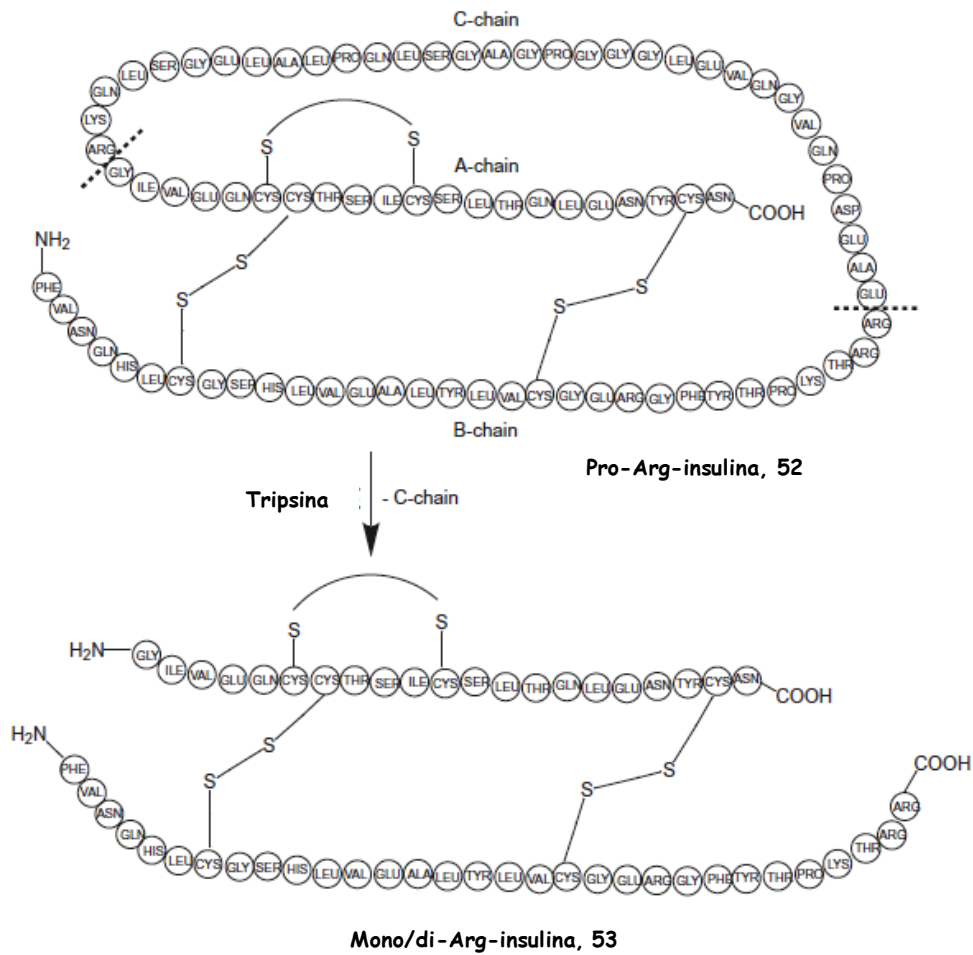
Esquema 19.- Producción de pro-insulina, transformada en insulina por transpeptidación.



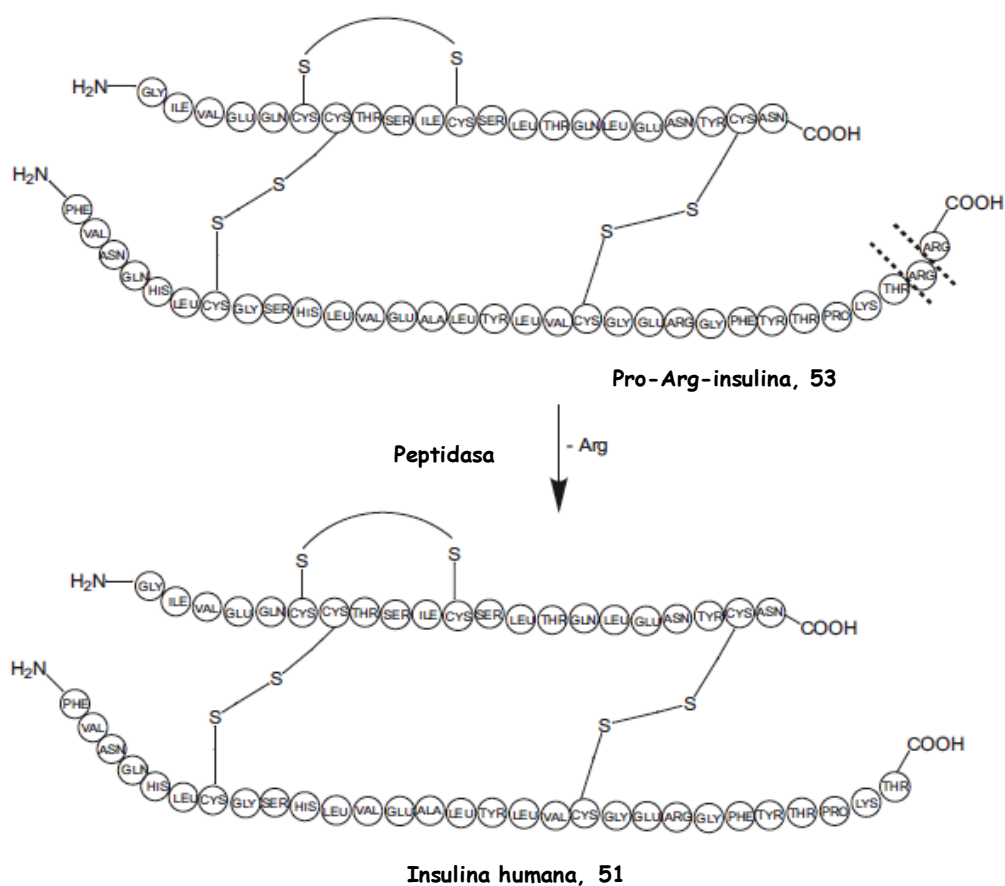
Esquema 20.- Hidrólisis enzimática de la insulina humana.

PRODUCCIÓN DE PRO-INSULINA USANDO CÉLULAS DE *E. COLI* MODIFICADAS GENÉTICAMENTE Y POSTERIORES PASOS DE SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN

En este caso, la compañía americana Eli Lilly ha puesto a punto la obtención de una pro-insulina (Pro-Arg-insulina, **52**) directamente por fermentación a partir de células de *E. coli* recombinante y que tras un primer tratamiento con tripsina de páncreas porcino, se obtiene un segundo precursor de la insulina (Mono/di-Arg-insulina, **53**) con un rendimiento del 70 % en un reactor de tanque agitado (Esquema 21). Posteriormente, esta mono/di-Arg-insulina **53**, sufre una segunda hidrólisis enzimática, utilizando para ello una peptidasa de páncreas porcino, que hidroliza los dos restos de arginina (Arg) presentes en el extremo C-terminal de la cadena B, con una conversión superior al 99%, un rendimiento del 95 % y una selectividad superior al 99 % (Esquema 22).



Esquema 21.- Producción de Mono/di-Arg-insulina, 53 a partir de Pro-Arg-insulina, 52 por tratamiento con tripsina.



Esquema 22.- Producción de insulina humana (51) a partir de Mono/di-Arg-insulina (53) por tratamiento peptidasa específica de Arg.

2.2.2. Proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* (Subtilisina Carlsberg)

La proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis*, también conocida como subtilisina Carlsberg o subtilisina A (EC 3.4.21.62), fue descubierta en 1947 por Linderstrom-Lang y Ottesen en los laboratorios Carlsberg, de ahí su nombre. Es una endopeptidasa con un peso molecular de 27,5 KDa, una temperatura óptima de trabajo de 60°C y un pH óptimo de 10. Presenta una amplia especificidad de sustrato, lo que le confiere una gran utilidad sintética. La triada catalítica la componen los residuos Ser221, His64 y Asp22. Un catión de calcio está presente en su estructura, pero no es necesario para su actividad.

Al igual que las lipasas, la subtilisina de Carlsberg se emplea en las resoluciones cinéticas de compuestos de interés industrial; como ejemplo citaremos la

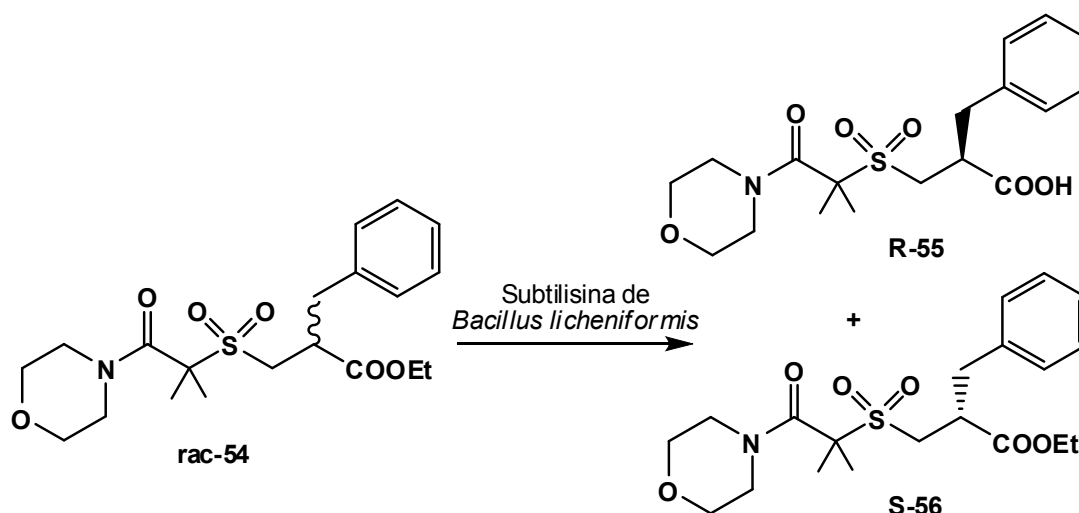
utilización de esta proteasa por la compañía suiza Hoffmann La-Roche para la obtención de un sintón quiral útil en la síntesis de inhibidores de la renina.

La renina es la enzima que limita la síntesis de angiotensina II y la activación del sistema renina-angiotensina (SRA), por lo que desde hace más de 50 años se han intentado desarrollar fármacos activos por vía oral capaces de inhibir directamente la renina. Recientemente, se ha demostrado que la prorrenina y renina son moléculas activas que interactúan con un receptor específico y que su estimulación activa diversas vías de señalización independientes de las activadas por la angiotensina II. El hallazgo de que la renina es la enzima que limita la activación del sistema SRA y de que en ausencia de renina no se sintetizan A-I o A-II, ha estimulado en los últimos 50 años la síntesis de fármacos inhibidores directos de la renina (IDR) (68-70).

A finales de los años ochenta, se desarrollaron nuevos IDR con estructura peptídica: **remikiren** y **ciprokiren** (70-72).

Finalmente, la identificación de la estructura del sitio activo de la renina mediante cristalografía de rayos X y las nuevas técnicas de modelado molecular nos han permitido diseñar una nueva familia de IDR no peptídicos y de bajo peso molecular que han superado todos estos inconvenientes, de los que el **aliskiren** es el primer representante (73). En la actualidad, se encuentran en fase clínica nuevos IDR, desarrollados por Actelion-Merck & Co., Pfizer, GlaxoSmithKline y Speedel (familias SPP600, SP800 y SPP1100).

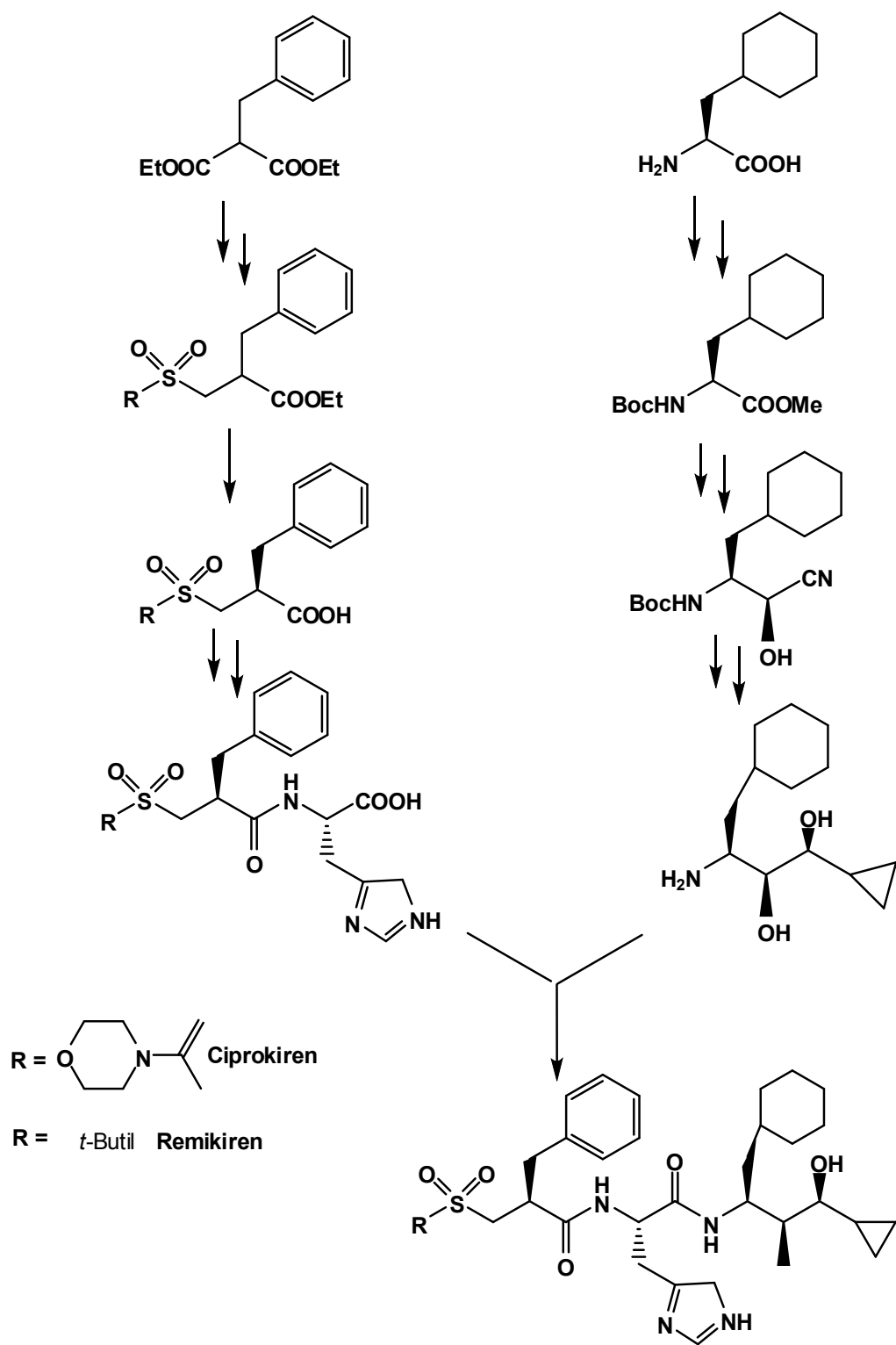
El proceso desarrollado por la compañía Hoffmann La-Roche está basado en la hidrólisis enantioselectiva del éster éfílico del ácido (*R,S*) 2-bencil-3-[[1-metil-1-((morfolin-4-il)carbonil)etil]sulfonil] propiónico (**54**) para la producción del sintón quiral ácido (*2R*) 2-bencil-3-[[1-metil-1-((morfolin-4-il)carbonil)etil]sulfonil] propiónico (**55**) (Esquema 23).



Esquema 23.- Hidrólisis enantioselectiva del éster racémico ra-54 para la obtención del síntón quiral R-55 utilizando la subtilisina de *Bacillus licheniformis*.

En este proceso, se utiliza como biocatalizador un preparado comercializado por la compañía Novo Nordisk de subtilisina Carlsberg, usado en la formulación de los detergentes (Optimase M 440 o Proteasa L 660), el cual es suspendido en un sistema bifásico (agua/disolvente orgánico en una proporción 1:1). La conversión obtenida en este proceso fue del 50 % y un exceso enantiomérico del 99 % (74).

Este síntón quiral **R-35** es crucial como intermedio quiral en la síntesis de **remikiren** y **ciprokiren**, inhibidores directos de la renina (Esquema 24).

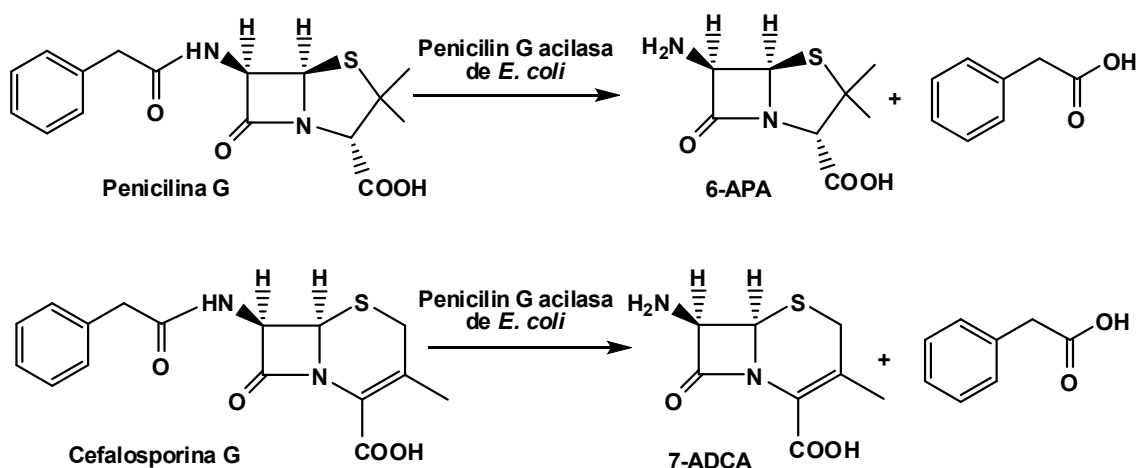


Esquema 24.- Ruta sintética para la obtención de los inhibidores de renina Ciprokiren y Remikiren.

3. PENICILIN G ACILASAS

Los antibióticos β -lactámicos, constituyen una de las familias más importantes del arsenal terapéutico actual. Los primeros antibióticos de este grupo fueron las penicilinas, descubiertas accidentalmente por Fleming en 1928, al observar la inhibición de la proliferación bacteriana en cultivos contaminados por el hongo *Penicillium notatum*. Sin embargo, no fue hasta 1940 cuando se pudo aislar el principio activo, la penicilina G y un poco más tarde, en 1945, pudo dilucidarse su estructura química, lo que impulsó el desarrollo de los métodos fermentativos y de síntesis parcial de análogos con mejores propiedades. También a mediados de los años cuarenta se descubrieron las cefalosporinas, un grupo de antibióticos β -lactámicos procedentes de hongos del género *Cephalosporum*.

La mayoría de las limitaciones químicas y farmacológicas de los antibióticos lactámicos, así como la obtención de los mismos en las cantidades requeridas para satisfacer su demanda, se han resuelto con éxito mediante el desarrollo de métodos de síntesis parcial. Sin embargo, el desarrollo de estos métodos no fue posible sin la previa optimización de determinados procesos de fermentación que permitirán la producción a gran escala de alguno de estos antibióticos para su empleo como precursores sintéticos de análogos con propiedades más interesantes (penicilina G y cefalosporina G, Esquema 25). Para ello, se requiere la puesta a punto de métodos eficaces para la obtención del ácido 6-aminopenicilánico (6-APA), del ácido 7-aminocefalosporánico (7-ACA) y del ácido 7-amino-3-desacetoxicefalosporánico (7-ADCA), así como su acilación posterior con precursores adecuados de la cadena lateral. Para la obtención del 6-APA, del 7-ACA ó 7-ADCA, se han descrito diversos procedimientos, entre los que destacan los basados en la hidrólisis enzimática de la cadena lateral de algunas penicilinas fácilmente accesibles por fermentación, como la penicilina G y cefalosporina G.



Esquema 25.- Obtención del 6-APA y 7-ADCA por hidrólisis enzimática de la penicilina G y cefalosporina G respectivamente.

La penicilina G acilasa (PGA) (EC. 3.5.1.11) se encuentra en la naturaleza en gran variedad de microorganismos (bacterias, actinomicetos, levaduras, hongos) (75). Es una de las enzimas más importantes en la biocatálisis, tanto por su uso industrial como por la cantidad de estudios académicos en los que se ha utilizado. Su actividad por excelencia es la hidrólisis de Penicilina G para formar 6-APA (importante precursor en la síntesis de antibióticos semi-sintéticos). Este proceso fue uno de los primeros en ser catalizados por un enzima (75). La PGA usada industrialmente y más estudiada es la proveniente de *E.coli*, (76). Su función natural no está muy definida, existiendo muchas dudas sobre el papel que juega en el metabolismo bacteriano, se ha sugerido que puede participar en la hidrólisis de compuestos fenilacetilados para generar ácido fenilacético, el cual sería utilizado como fuente de carbono (77).

Diferentes compañías llevan a cabo la hidrólisis enantioselectiva de estas bencilpenicilinas o bencilcefalosporinas, obteniéndose intermedios sintéticos (6-APA o 7-ADCA) a gran escala. Para la obtención del 6-APA, podemos citar a la compañía Dr. Vig Medicaments (India), que lleva a cabo la obtención de este intermedio mediante la penicilin G acilasa de *E. coli* o de *Arthrobacter viscosus* inmovilizada en medio acuoso a pH=8 y 37°C. Este proceso, se lleva a cabo en un reactor de tanque agitado de 2.000 L de capacidad, obteniéndose un 99 % de conversión, 93 % de rendimiento y un 94 % de selectividad. Este mismo proceso, es llevado a cabo por

otras compañías como Unifar o Asahi Kasei Chemicals Corporation; en este caso también se utiliza la penicilin G acilasa de *E. coli* ó *Bacillus megatarium* inmovilizada en Eupergit C, un polímero funcionalizado por grupos epóxidos. Tras 800 ciclos de reutilización del biocatalizador el tiempo de la reacción se incrementa de 60 minutos a 120 (78).

Para la obtención del anillo de las cefalosporinas (7-ADCA) también se utiliza la misma estrategia, a partir de la cefalosporina G y mediante la utilización de la penicilin G- acilasa de *E. coli* o *Arthrobacter viscosus* inmovilizada se obtiene el 7-ADCA con unos rendimientos del 93 %.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Beck, G. Synthesis of chiral drug substances, *Synlett* **2002**, 6, 837-850.
2. Suami, T.; Hough, L. Molecular mechanisms of sweet taste 3: aspartame and its non-sweet isomers, *Food Chem.* **1993**, 46, 235-238.
3. Koeller, K. M.; Wong, C. H. Enzymes for chemical synthesis, *Nature* **2001**, 409, 232-240.
4. (a) Müller, M. Chemical diversity through biotransformations, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, 15, 591-598; (b) Challis, G. L.; Hopwood, D. A. Chemical biotechnology: bioactive small molecules.targets and discovery technologies, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, 18, 475.
5. (a) Schmid, A.; Dordick, J. S.; Hauer, B.; Kiener, A.; Wubbolt, M.; Witholt, B. Industrial biocatalysis today and tomorrow, *Nature* **2001**, 409, 258-268; (b) Sandford, V.; Breuer, M.; Hauer, B.; Rogers, P.; Rosche, B. (*R*)-phenylacetylcarbinol production in aqueous/organic two-phase systems using partially purified pyruvate decarboxylase from *Candida utilis*, *Biotechnol. Bioeng.* **2005**, 91, 190-198; (c) Schmid, A.; Hollmann, F.; Park, J. B.; Bühler, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, 13, 359-366; (d) Schoemaker, H. E.; Mink, D.; Wubbolts, M. G. Biocatalysis in Industrial Synthesis, *Science* **2003**, 299, 1694-1697.
6. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry* Springer-Verlag; Heidelberg, **2004**.
7. (a) Griengl, H.; Schwab, H.; Fechter, M. The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases, *Trends Biotechnol.* **2000**, 18, 252-256; (b) Effenberger, F.; Forster, S.; Wajant, H. Hydroxynitrile lyases in stereoselective catalysis, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, 11, 532-539; (c) Domínguez de María, P.; Stillger, T.; Pohl, M.; Wallert, S.; Drauz, K.; Gröger, H.; Trauthwein, H.; Liese, A. Preparative enantioselective synthesis of benzoin and (*R*)-2-hydroxy-1-phenylpropanone using benzaldehyde lyase, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2006**, 38, 43-47.

8. (a) Faber, K.; Patel, R. Chemical biotechnology. A happy marriage between chemistry and biotechnology: asymmetric synthesis via green chemistry, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 517-519; (b) Loughlin, W. A. Biotransformations in organic synthesis, *Bioresource Technology* **2000**, *74*, 49-62.
9. Alcalde, M.; Ferrer, M.; Plou, F. J.; Ballesteros, A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes, *Trends Biotechnol.* **2006**, *24*, 281-287.
10. (a) Lee, M. Y.; Dordick, J. S. Enzyme activation for nonaqueous media, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 376-384; (b) Gupta, M. N.; Roy, I. Enzymes in organic media. Forms, functions and applications, *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2575-2583.
11. Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernández-Lorente, G.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451-1463.
12. (a) Bornscheuer, U. T.; Pohl, M. Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 137-142; (b) Berglund, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis, *Biomol. Eng.* **2001**, *18*, 13-22; (c) Bornscheuer, U. T. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 543-547; (d) Reetz, M. T.; Carballeira, J. D.; Vogel, A. Iterative Saturation Mutagenesis on the Basis of B Factors as a Strategy for Increasing Protein Thermostability, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7745-7751; (e) Taglieber, A.; Höbenreich, H.; Carballeira, J. D.; Mondière, R. J. G.; Reetz, M. T. Alternate-site enzyme promiscuity, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8597-8600.
13. Schmid, R. D.; Verger, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chem., Int. Ed.* **1998**, *37*, 1608-1633.
14. Gotor-Fernández, V.; Brieva, R.; Gotor, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation pharmaceuticals, *J. Mol. Cat. B: Enzym.* **2006**, *40*, 111-120.
15. Cygler, M.; Grochulski, P.; Kazlauskas, R. J.; Schrag, J. D.; Bouthillier, F.; Rubin, B.; Serrege, A. N.; Gupta, A. K. Molecular Basis for the enantiopreference of lipases toward secondary alcohols, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 3180-3186.
16. Kirchner, G.; Scollar, M. P.; Klivanov, A. M. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic media, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7072-7076.
17. (a) Kitaguchi, H.; Fitzpatrick, P. A.; Huber, J. E.; Klivanov, A. M. Enzymic resolution of racemic amines: crucial role of the solvent, *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 3094-3095 (b) González-Sabin, J.; Lavandera, I.; Rebolledo, F.; Gotor, V. Redesigning the mechanism of the lipase-catalysed aminolysis of esters, *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 1264-1274.
18. (a) Alfonso, I.; Gotor, V. Biocatalytic and biomimetic aminolysis reactions: useful tools for selective transformations on polyfunctional substrates, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 201-209.

(b) Gotor, V. Non-Conventional hydrolase chemistry: amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189-2197

19. Björling, F.; Godtfredsen, S.E. The future-impact of industrial lipases, *Trends Biotechnol.* **1991**, *9*, 360-636.

20. Gotor, V.; Astorga, C.; Rebolledo, F. An improved method for the preparation of acylhydrazines: the 1st example of an enzymatic hydrazinolysis reaction, *Synlett* **1990**, 387-388

21. Silver, M. S. Hydrolysis of conformationally homogeneous substrates by α -chymotrypsin. consequences of enzymatic specificity, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 4247-4253.

22. (a) Bornscheuer, U. T.; Kazlauskas, R. J. Catalytic promiscuity in biocatalysis: Using old enzymes to form new bonds and follow new pathways, *Angew. Chem.* **2004**, *43*, 6032-6040; (b) O'Brien, P. J, Catalytic promiscuity and the divergent evolution of DNA repair enzymes, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 720-752; (c) Yoshikuni, Y.; Ferrin, T. E.; Keasling, J. D. Designed divergent evolution of enzyme function, *Nature* **2006**, *440*, 1078-1082.

23. Hult, K.; Berglund, P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231-238.

24. Magnusson, A. O.; Takwa, M.; Hamberg, A.; Hult, K. An S-selective lipase was created by rational redesign and the enantioselectivity increased with temperature, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4582-4585.

25. Reetz, M. T.; Bocola, M.; Carballeira, J. D.; Zha, D.; Vogel, A. Expanding the range of substrate acceptance of enzymes: Combinatorial active-site saturation test, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4192-4196.

26. Reetz, M. T.; Plus, M.; Carballeira, J. D.; Vogel, A.; Jaeger, K. E.; Eggert, T.; Thiel, W.; Bocola, M.; Otte, N. Learning from directed evolution: Further lessons from theoretical investigations into cooperative mutations in lipase enantioselectivity, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 106-112.

27. Torre, O.; Alfonso, I.; Gotor, V. Lipase catalysed Michael addition of secondary amines to acrylonitrile, *Chem. Commun.* **2004**, *15*, 1724-1725.

28. Branneby, C.; Carlqvist, P.; Magnusson, A.; Hult, K.; Brinck, T.; Berglund, P. Carbon-carbon bonds by hydrolytic enzymes, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 874-875.

29. Taglieber, A.; Höbenreich, H.; Carballeira, J. D.; Mondière, R. J. G.; Reetz, M. T. Alternate-site enzyme promiscuity, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 8597-8600.

30. Domínguez de María, P.; Sánchez-Montero, J.M.; Sinisterra, J.V.; Alcantara, A.R. Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview, *Biotechnol. Adv.* **2006**, *24*, 180-196.

31. Grochulski, P.; Li, Y.; Schrag, J.D.; Bouthillier, F.; Smith, P.; Harrison, D.; Rubin, B.; Cygler, M. Insights into interfacial activation from an open structure of *candida-rugosa* lipase, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 12843-12849.
32. Abramowicz, D.A.; Keese, C.R. Enzymatic transesterifications of carbonates in water-restricted environments, *Biotechnol. Bioeng.* **1989**, 22, 149-155.
33. Hoshino, O.; Itoh, K.; Umezawa, B.; Akita, H.; Oishi, T. Immobilized lipase catalyzed-hydrolysis of labile acetate: enantioselective hydrolysis of (+/-)-4-acetoxy-1,2,3,4-tetrahydro-6,7-dimethoxy-2-methylisoquinoline, *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29, 567-570.
34. Samuelsson, B.; Goldyme, M.; Granstrom, E.; Hamberg, M.; Hammarstrom, S.; Malmsten, C. Prostaglandins and thromboxanes, *Ann. Rev. Biochem.* **1978**, 47, 997-1020.
35. Roszkows, A.P.; Rooks, W.H.; Tomoloni, A.J.; Miller L-M. Anti-inflammatory and analgetic properties of D-2-(6'-methoxy-2'-naphthyl)-propionic acid (naproxen), *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1971**, 179:114.
36. Adams, S. S.; Bresloff, P.; Mason, G.G. Pharmacological differences between optical isomers of ibuprofen - evidence for metabolic inversion of (-)-isomer, *J. Pharm. Pharmacol.* **1976**, 28, 256.
37. Caldwell, J.; Hutt, A.J.; Fournelgigleux, S. The metabolic chiral inversion and dispositional enantioselectivity of the 2-arylpropionic acids and their biological consequences, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, 37, 105.
38. Brune, K.; Beck, W.S.; Geisslinger, G.; Menzelsoglowek, S.; Peskar, B.M.; Peskar, B.A. Aspirin-like drugs may block pain independently of prostaglandin synthesis inhibition, *Experientia* **1991**, 47, 257.
39. Alcántara, A.R., J.M. Sánchez Montero and J.V. Sinisterra. Chemoenzymatic preparation of enantiomerically pure S(+) 2-arylpropionic acids with anti-inflammatory activity in *Stereoselective Biocatalysis*. (Patel, R. N., ed), 659, **2000**.
40. (a) Cesti, P., Piccardi, P. Process for the biotechnological preparation of optically active arylalkanoic acids, **1986**, Montedison S.p.A., Italy, EP 195717 A2; (b) Lopez, J.L., Wald, S.A., Matson, S.L., Quinn, J.A. Multiphase membrane reactors for separating stereoisomers, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1990**, 613, 155–166; (c) McConville, F.X., Lopez, J.L., Wald, S.A. Enzymatic resolution of ibuprofen in a multiphase membrane reactor, **1990** in: *Biocatalysis* (Abramowicz, D.A., ed.) pp.167–177, van Nostrand Reinhold, New York; (d) Sheldon, R.A. **1993**, Chirtechnology, Marcel Dekker Inc., New York; (e) Sih, C. J. **1987**, Process for preparing (S)-methylarylacetic acids, Wisconsin Alumni Research Foundation, USA, EP 227078 A.
41. Patkar, S.A.; Bjorkling, F.; yndel, M.; Schulein, M.; Svendsen, A.; Heldt-Hansen, H.P.; Gormsen, E. Purification of 2 lipases from *Candida antarctica* and their inhibition by various inhibitors, *Indian J. Chem.* **1993**, 32B, 76-80.

42. Anderson, E.M.; Larssen, K.M.; Kirk, O. One biocatalyst - Many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis, *Biocatal. Biotransform.* **1998**, 16, 181-204.
43. Uppenberg, J.; Hansen M.T.; Patker, S.; Jones, T.A. Sequence, crystal-structure determination and refinement of 2 crystal forms of lipase-B from *Candida Antarctica*, *Structure*, **1994**, 2, 293-308.
44. Arroyo, M.; Sánchez-Montero, J.M.; Sinisterra, J.V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media, *Enzyme Microbiol. Technol.* **1999**, 24, 3-12.
45. (a) Morgan, B., Dodds, D.R., Zaks, A., Andrews, D.R., Klesse, R. Enzymatic desymmetrization of prochiral 2-substituted-1,3-propanediols: A practical chemoenzymatic synthesis of a key precursor of SCH51048, a broad-spectrum orally active antifungal agent, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 7736-7743; (b) Morgan, B., Stockwell, B.R., Dodds, D.R., Andrews, D.R., Sudhakar, A.R., Nielsen, C.M., Mergelsberg, I., Zumbach, A. Chemoenzymatic approaches to SCH 56592, a new azole antifungal, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, 74, 1361-1370; (c) Pantaleone, D.P. **1999**, Biotransformations: "Green" processes for the synthesis of chiral fine chemicals, in: Handbook of Chiral Chemicals (Ager, D.J., ed.) pp. 245-286, Marcel Dekker Inc., New York; (d) Saksena, A.K., Girijavallabhan, V.M., Pike, R.E., Wang, H., Lovey, R.G., Liu, Y.-T., Ganguly, A.K., Morgan, W.B., Zaks, A. **1995**, Process for preparing intermediates for the synthesis of antifungal agents, Schering Corporation, US 5,403,937; (e) Saksena, A.K., Girijavallabhan, V.M., Wang, H., Liu, Y.-I., Pike, R.R., Ganguly, A.K. Concise asymmetric routes to 2,2,4-trisubstituted tetrahydrofurans via chiral titanium imide enolates: Key intermediates towards synthesis of highly active azole antifungals SCH 51048 and SCH 56592, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 5657-5660; (f) Zaks, A., Dodds, D.R. Application of biocatalysis and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals, *Drug Discovery Toda*, **1997**, 2 (6), 513-531.
46. Saksena, A.K.; Girijavallabhan, V.M.; Lovey, R.G.; Desai, J.A.; Pike, R.E.; Jao, E.; Wang, H.; Ganguly, A.K.; Loebenberg, D.; Hare, R.S.; Cacciapuoti, A.; Parmegiani, R.M. Sch 51048, a novel broad-spectrum orally active antifungal agent: Synthesis and preliminary structure-activity profile, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, 5, 127-132.
47. Samanen, J. M.; Ali, F. A.; Barton, L. S.; Bondinell, W. E.; Burgree, J. L.; Callahan, J. F.; Calvo, P. R.; Chen, W.; Chen, L.; Erhard, K.; Feuerstein, G.; Heys, R.; Hwang, S.-M.; Jakas, D. R.; Keenan, R. M.; Ku, T. W. Kwon, C.; Lee, C.-P.; Miller, W. H.; Newlander, K. A.; Nichols, A.; Parker, M.; Peishoff, C. E.; Rhodes, G.; Ross, S.; Shu, A.; Simpson, R.; Takata, D.; Yellin, T.-O.; Uzsinskas, I.; Veslavsky, J. W.; Yuan, C.-K.; Huffman, W. F. Potent, selective, orally active 3-oxo-1,4-benzodiazepine GPIIb/IIIa integrin antagonists, *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 4867.
48. Walsgrove, T.C., Powell, L., Wells, A. Lotrafiban, [(2S)-7-(4,4'-bipiperidinylcarbonyl)-2,3,4,5,-tetrahydro-4-methyl-4-oxo-1H-1,4-benzodiazepine-2-acetic acid] utilising an enzymatic resolution as the final step, *Org. Proc. Res. Dev.* **2002**, 6, 488-491.

49. Stead, P., Marley, H., Mahmoudian, M., Webb, G., Noble, D., Ip, Y.T., Piga, E., Rossi, T., Roberts, S., Dawson, M.J. Efficient procedures for the large-scale preparation of (1*S*,2*S*)-*trans*-2-methoxycyclohexanol, a key chiral intermediate in the synthesis of tricyclic β lactam antibiotics, *Tetrahedron: Asymmetry*, **1996**, 7 (8), 2247–2250.
50. Kim, K.K; Song, H.R.; Shin, D.H.; Hwang, K.Y.; Suh, S.E. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor, *Structure*, **1997**, 5, 173-183.
51. Holton, R.; Biediger, R.J.; Boatman, P.D., Semisynthesis of taxol and taxotere, in *Taxol: Science and Application*, Suffness, M., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 97–121, **1995**.
52. Baldini, E. et al, Multicenter randomized phase III trial of Epirubicin plus Paclitaxel vs. Epirubicin followed by Paclitaxel in metastatic breast cancer patients: focus on cardiac safety, *British J. Cancer.*, **2004**, 91, 45-49.
53. Patel, R.N.; Banerjee, A.; Ko R.Y.; Howell, J.M.; Li, W.S.; Comezoglu, F.T.; Partyka, R.A.; Szarka, L.E. *Biotech. Appl. Biochem.*, **1994**, 20, 23-33.
54. Patel R.N. Tour de paclitaxel: biocatalysis for semisynthesis, *Ann. Rev. Microbiol.*, **1995**, 98, 361-395.
55. De Caro, J.; Boudouard, M.; Bonicel, J.; Guidoni, A.; Desnuelle, P.; Rovey, M. Porcine pancreatic lipase. Completion of the primary structure. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, 671, 129-138.
56. (a) Sheldon, R.A. 1993, *Chirotechnology*, Marcel Dekker Inc., New York; (b) Elferink, V.H.M. **1995**, *Chiral USA 96*, 11th International Spring Innovations Chirality Symposium, pp. 79–80, Boston.
57. Hulshof, L.A. and Roskam, J.H. Phenylglycidate stereoisomers, conversion products thereof with e.g. 2-nitrophenol and preparation of diltiazem. European Patent EP0343714. (Chem. Abstr. 113, 76603) **1989**.
58. Matsumae, H.; Furui, M.; Shibatani, T. Lipase catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride, *J. Ferm. Bioeng.* **1993**, 75, 93-98.
59. Matsumae, H.; Furui, M.; Shibatani, T.; Tosa, T. Production of optically-active 3-phenylglycidic acid ester by the lipase from *Serratia marcescens* on a hollow-fiber membrane reactor, *J. Ferment. Bioeng.* **1994**, 78, 59-63.
60. Furui, M.; Furutani, T.; Shibatani, T.; Nakamoto, Y.; Mori, T. A membrane bioreactor combined with crystallizer for production of optically active (2*R*,3*S*)-3-(4-metoxifenil) glycidic acid methyl ester *J. Ferm. Bioeng.*, **1996**, 81, 21-25.

61. (a) Arpigny, J. L.; Jaeger, K. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties, *Biochem. J.* **1999**, 343, 177–183; (b) Rosenau, F.; Jaeger, K. E. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion, *Biochimie*, **2000**, 82, 1023–1032.
62. Barré-Sinoussi, F.; Chermann, J.C.; Rey, F.; Nugeyre, M.T.; Chamaret, S.; Gruest, T.; Dauguet, C.; Alex-Blin, C.; Bezinet-Brun, F.; Rouxioux, C.; Rozenbaum, W.; Montaigner L. Isolation of a t-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune-deficiency syndrome (AIDS), *Science* **1983**, 220, 868-871 b) Gallo, R.C.; Salahuddin, S.Z.; Popovic, M.; Shearer, G.M.; Kaplan, G.M.; Haynes, B.F.; Palker, T.J.; Redfield, R.; Oleska, J.; Safai, B.; White, G.; Foster, P.; Markhan P. D. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (htlv-iii) from patients with aids and at risk for aids, *Science* **1984**, 224, 500-503. c) Furman, P.A.; Fyle, J. A.; St. M.H.; Clair, K. Wein, K.; Rideout, J.I.; Freeman, G.A.; Lehrman, S.N.; Bolognesi, D.P.; Broder, S.; Mitsuya, H.; Barry D.W. phosphorylation of 3'-azido-3'-Deoxythymidine and selective interaction of the 5'-triphosphate with human-immunodeficiency-virus reverse-transcriptase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 8333-8337.
63. Williamson, C.; Jones, M.F.; Mo, C.L.; Myers, P.L.; Paternoster, I.L.; Storer, R. Presentación en el “Internacional Symposium on Chemotherapy”, Porto Cervo, Cerdeña, Italia, Octubre 1-15, **1989**. b) R. Vince, H. Hua *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 17.
64. (a) Evans, C.T.; Roberts, S.M.; Shoberu, K.A.; Sutherland, A.G. Potential use of carbocyclic nucleosides for the treatment of AIDS: Chemo-enzymatic syntheses of the enantiomers of carbovir, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1992**, 1, 589–592; (b) MacKeith, R.A.; McCague, R.; Olivo, H.F.; Palmer, C.F.; Roberts, S.M. Conversion of (–)-4-hydroxy-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-7-en-3-one into the anti-HIV agent Carbovir, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1993**, 1, 313–314; (c) MacKeith, R.A., McCague, R., Olivo, H.F., Roberts, S.M., Taylor, S.J.C., Xiong, H. Enzyme-catalysed kinetic resolution of 4-endo-hydroxy-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-7-en-3-one and employment of the pure enantiomers for the synthesis of anti-viral and hypocholesteremic agents, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2, 387–394; (d) Taylor, S.J.C.; McCague, R. Resolution of a versatile hydroxylactone synthon 4-endo-hydroxy- 2-oxabicyclo[3.3.0]oct-7-en-3-one by lipase deesterification in: *Chirality In Industry II* (Collins, A. N., Sheldrake, G. N. and Crosby, J., eds.), 1997, pp. 190–193, John Wiley & Sons, New York.
65. Rao, M.B.; Tanskale, A.P.; Ghatge, M.S.; Deshpande, V.V.; Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1998**, 62, 597-635.
66. Rawlings, N.D.; Barrett, A. J. Proteolytic enzymes: aspartic and metallo peptidases, *Methods Enzymol.* **1995**, 248, 183-228.
67. (a) Frank, B.H.; Chance, R.E. Two routes for producing human insulin utilizing recombinant DNA technology, *Münch. Med. Wschr.* **1983**, 125, 14–20; (b) Ladisch, M.R.; Kohlmann, K.L. Recombinant human insulin, *Biotechnol. Prog.* **1992**, 8, 469–478.
68. Rongen GA, Lenders JWM, Smiths P, Thien T. Clinical pharmacokinetics and efficacy of renin inhibitors, *Clin. Pharmacokinet.* **1995**, 29, 6-14.

- 69.. Lin C, Frishman WH. Renin inhibition: a novel therapy for cardiovascular disease, *Am. Heart J.* **1996**, 131, 1024-34.
70. Staessen JA, Li Y, Richart T. Oral renin inhibitors, *Lancet*, **2006**, 368, 1449-56.
71. Himmelmann, A.; Bergbrant, A.; Svensson, A.; Hansson, L.; Aurell, M. Remikiren (Ro 42-5892) an orally active renin inhibitor in essential hypertension. Effects on blood pressure and the reninangiotensin aldosterone system, *Am. J. Hypertens.* **1996**, 9, 517-22.
72. Rahuel, J.; Rasetti, V.; Maibaum, J.; Rüeger, H.; Göschke, R.; Cohen, N.C. Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human rennin. *Chem Biol.* **2000**, 7, 493-50.
73. Wood, J.M.; Maibaum, J.; Rahuel, J.; Grütter, M.G.; Cohen, N.C.; Rasetti, V. Structure-based design of aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 308, 698-705.
74. (a) Doswald, S.; Estermann, H.; Kupfer, E.; Stadler, H.; Walther, W.; Weisbrod, T.; Wirz, B.; Wostl, W. Large scale preparation of chiral building blocks for the P3 site of renin inhibitors, *Bioorg. Med. Chem.* **1994**, 2, 403-410; (b) Wirz, B.; Weisbrod, T.; Estermann, H. Enzymatic reaction in process research: the importance of parameter optimization and workup, *Chimica Oggi.* **1995**, 14, 37-41.
75. (a) Sudhakaran, V. K.; Deshpande, B.S.; Ambedkar, S.S.; Shewale, J.G. Molecular aspects of penicillin and cephalosporin acylases, *Process Biochem.* **1992**, 27, 131-143; (b) Verhaert, R. M.; Riemens, A. M.; van der Laan, J. M.; van Duin, J.; Quax, W. J. . Molecular cloning and analysis of the gene encoding the thermostable penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*, *Appl. Environ. Microbiol.* **1997**, 63, 3412-8; (c) Parmar, A.; Kumar, H.; Marwaha, S.S.; Kennedy, J. F. Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA), *Biotechnol Adv.* **2000**, 18, 289-301.
76. Trasvascio, P.; Zito, E.; Portaccio, M.; Diano, V.; Di Martino, S.; Bertolini, T.; Rossi, S.; Mita, D.G. Enzyme reaction engineering: effect of metanol on the synthesis of antibiotics catalyzed by immobilized Penicillin G acylase under isothermal and non-isothermal conditions, *Biotechnol. Prog.* **2002**, 18, 975-985.
77. (a) Valle, F.; Balbas, P.; Merino, E.; Bolivar, F. The role of penicillin amidases in nature and in industry, *Trends Biochem. Sci.* **1991**, 16, 36-40; (b) Duggleby, H. J.; Tolley, S. P.; Hill, C. P.; Dodson, E. J.; Dodson, G.; Moody, P. C. Penicillin acylase has a single-amino-acid catalytic center, *Nature*, **1995**, 373, 264-8; (c) Prieto, M. A.; Diaz, E.; Garcia, J. L. J. Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: Engineering a mobile aromatic degradative cluster, *Bacteriol.* **1996**, 178, 111-20; (d) Done, S. H.; Brannigan, J. A.; Moody, P. C.; Hubbard, R. E. Ligand-induced conformational change in penicillin acylase, *J. Mol. Biol.* **1998**, 284, 463-75; (e) Arroyo, M.; de la Mata, I.; Acebal, C.; Castillon, M. P. Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 60, 507-14.

78. (a) Cheetham, P. (1995) The application of enzymes in industry, in: Handbook of Enzyme Biotechnology (Wiseman, A. ed.), pp. 493–498, Ellis Horwood, London; (b) Matsumoto, K. (1993) in: Industrial Application of Immobilized Biocatalysts (Tanaka, A., Tosa, T., Kobayashi, T. eds.) pp. 67–88, Marcel Dekker Inc., New York; (c) Tramper, J. Chemical versus biochemical conversion: when and how to use biocatalysts, *Biotechnol. Bioeng.* 1996, 52, 290–295.